

Institut für Pflanzenkrankheiten
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

**Die Interaktion des Pilzes *Chaetomium globosum* mit der Gerste
(*Hordeum vulgare*) und dem Echten Gerstenmehltau
(*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*)**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades
Doktor der Agrarwissenschaften
(Dr. agr.)
der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

Vorgelegt am 05.10.2000
von
Annette Reissinger
aus Landau

Referent: Prof. Dr. R.A. Sikora

Korreferent: Prof. Dr. H. Schnabl

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2000

Gedruckt bei: ACS Schnelldruck, Bonn

Für eine Behauptung ist es entscheidend, daß sie interessant erscheint, und weniger, daß sie der Wahrheit entspricht... doch selbstverständlich ist eine wahre Behauptung in der Regel interessanter als eine, die nicht zutrifft.

Alfred North Whitehead

Aus: W.F. Allman. *Der Mammutjäger in der Metro*

Die Interaktion des Pilzes *Chaetomium globosum* mit der Gerste (*Hordeum vulgare*) und dem Echten Gerstenmehltau (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*)

Die Besiedlung einer Pflanze mit endophytischen Pilzen kann eine tiefgreifende Änderung des physiologischen Zustands der Pflanze bewirken, welcher sich unter anderem in einer veränderten Interaktion mit Schaderregern ausdrückt. In den hier vorliegenden Untersuchungen zeigte der saprophytische Pilz *Chaetomium globosum* endophytisches Wachstum in den Wurzeln der Gerste (*Hordeum vulgare*). Die Besiedlung der Wurzeln war bei Verwendung eines synthetischen Kultursubstrats für die Pflanzenanzucht auch mit einer Symptomausprägung in Form von Verbräunungen der Wurzelrinde verbunden. Mittels histologischer und serologischer Methoden wurde die Besiedlung des Gewebes untersucht. Ausgehend von der Rhizosphäre erfolgte die Ausbreitung des Pilzes intrazellulär in den Epidermiszellen und inter- sowie intrazellulär in den äußeren Schichten des Rindenparenchyms. Gleichzeitig konnten Abwehrreaktionen der Pflanze auf mikroskopischer Ebene in Form von Zellwandverbräunungen, hemisphärischen und papillenähnlichen Zellwandauflagerungen und einer Autofluoreszenz der unmittelbar an die Hyphen angrenzenden Zellwände beobachtet werden. Außerdem schien die Ausbreitung des Pilzes im Interzellularraum durch die Bildung einer anamorphen Substanz eingeschränkt zu sein. Der Nachweis von *C. globosum* in den Wurzeln gelang im Gegensatz dazu nicht mittels einer Oberflächensterilisation des Gewebes, da die einzig effektive Methode zur Abtötung oberflächlich anhaftender Ascosporen gleichzeitig auch zur Abtötung der in der Epidermis gelegenen Hyphen führte [1]. Eine Blattspreitenbesiedlung durch *C. globosum* konnte in allen durchgeführten Untersuchungen nicht gefunden werden.

Hinweise auf Wirkungsmechanismen der in diesem Zusammenhang schon bekannten Resistenzhöhung der Pflanze gegenüber dem Erreger des Echten Mehltaus, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* [2], wurden durch die beobachteten induzierten Abwehrreaktionen in der Wurzel speziell in einer verstärkten Pathogenabwehr in den Primärblättern der Pflanze gesucht. Es konnten jedoch 41 h nach Inokulation mit *E. graminis* in den mit *C. globosum* besiedelten Pflanzen mikroskopisch weder verstärkte Abwehrreaktionen, noch ein veränderter Infektionsprozeß festgestellt werden. Sowohl die Konidienkeimung, als auch die Appressorien- und Haustorienbildung und die Reproduktion des Pathogens waren unbeeinflusst. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion der Konidienanhaftung von *E. graminis* an die Blattoberfläche, die sich in einer verringerten Konidiendichte äußerte. Es wird deshalb ein induziertes und systemisch transloziertes Signal vermutet, das die Konidienkeimung und damit die Anhaftung von *E. graminis* f. sp. *hordei* an die Blattoberfläche in einem sehr frühen Stadium der Pathogenese verringert.

The interaction of the fungus *Chaetomium globosum* with the powdery mildew pathogen *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* on barley (*Hordeum vulgare*)

Fungal endophytic colonization of plants can change their metabolic activity leading to a modified defense response to subsequent pathogen attack. It could be shown that the saprotrophic fungus *Chaetomium globosum* is able to grow endophytically in barley roots (*Hordeum vulgare*). The colonization included symptomatic discoloration of the root cortex if a synthetic culture substrate was used for plant growth. The colonization of the root tissue by *C. globosum* was investigated with histological and serological techniques. The fungus colonized the epidermis intracellularly, while the outermost cortex layer was colonized inter- and intracellularly. The colonization always originated from the rhizosphere. The inter- and intracellular growth was accompanied by host responses including autofluorescence and brown discoloration of cell walls adjacent to hyphae and hemispherical or papilla like protuberances of cell walls. Additionally, an anamorphic substance which was found in the intercellular spaces, seemed to block the intercellular growth of the fungus. In contrast to these findings *C. globosum* could not be reisolated from the roots by means of surface sterilization techniques. The only sterilant being effective to ascospores on the plant surface penetrated the epidermal root tissue and caused damage to this area [1]. Consequently, *C. globosum* hyphae growing in this tissue could not be detected. Using microscopical and serological methods, no colonization of leaf blades could be found.

To determine the mode of action leading to the reduced disease severity of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, which was described previously [2], increased plant defense responses in the primary leaves induced by the defense of *C. globosum* in the roots were investigated. However, on a microscopical level no increased defense responses could be found in plants colonized by *C. globosum*. Additionally there was no indication for a modified infection process of *E. graminis* konidiospores 41 h post inoculation. The conidial germination of the pathogen, as well as the appressorium and haustorium formation, i.e. the successful penetration of the epidermis, and the reproduction was not altered. However, a general reduction of attached conidia was found on the leaf surfaces of plants colonized by *C. globosum* compared to mock treated controls. This observation indicates for a *C. globosum* inducible, and systemically diffusible signal which acts on early stages of pathogenesis, i.e. the attachment of konidiospores to the leaf surface, via an altered conidial germination.

References

- [1] Reissinger, A., Vilich, V., Sikora, R.A. (2001). Detection of fungi *in planta*: effectiveness of surface sterilization methods. Mycological Research, in press.
- [2] Vilich, V., Dolfen, M., Sikora, R.A. (1998). *Chaetomium* spp. colonization of barley following seed treatment and its effect on plant growth and *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* disease severity. Journal of Plant Diseases and Protection 105, 130-139.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Die Gerste und ihr Pathogen <i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	1
1.2	Die Gattung <i>Chaetomium</i>	2
1.3	Wechselwirkung von <i>Chaetomium</i> spp. mit Phytopathogenen	5
1.4	Bedeutung einer endophytischen Besiedlung durch Pilze für die Pflanze	7
1.5	Ziele der Arbeit	8

2 Material und Methoden

2.1	Versuchsorganismen	10
2.2	Pflanzenanzucht	10
2.2.1	Pflanzenanzucht im MS - Kultur mit bzw. ohne <i>Chaetomium globosum</i>	10
2.2.2	Pflanzenanzucht in Felderde mit bzw. ohne <i>C. globosum</i>	11
2.3	Inokulum der Pilze und Inokulation	12
2.4	Bewertung des Befallsverlaufs von <i>Erysiphe graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	13
2.4.1	Entwicklung und Konidienanhaftung von <i>E. graminis</i>	13
2.4.2	Reproduktion von <i>E. graminis</i>	14
2.5	Bewertung der Pflanzenentwicklung	14
2.6	Oberflächensterilisation	14
2.6.1	Ascosporenvitalitätstest auf Nitrocellulosemembranen	15
2.6.2	Vitalitätstest für Ascosporen die axenischen Gerstenpflanzen anhaften	15
2.6.3	Nachweis von <i>C. globosum</i> in planta mittels Oberflächensterilisation	16
2.7	Herstellung der Antikörper	16
2.7.1	Extraktion von Pilzantigenen zur Immunisierung von Versuchstieren	16
2.7.2	Herstellung polyklonaler Antikörper	17
2.7.3	Herstellung monoklonaler Antikörper	18
2.8	Serologische Nachweismethoden von <i>C. globosum</i>	19
2.8.1	Plate Trapped Antigen (PTA) - ELISA	19
2.8.2	Immunfluoreszenzmarkierung (IMF)	21
2.8.3	Bestimmung der pilzlichen Biomasse mittels PTA-ELISA	22
2.8.4	Tissue Print Immunoblot (TPI)	23
2.8.5	Immunfluoreszenz (IMF) - Markierung an Hand- und Semidünnschnitten	24
2.9	Präparationstechniken	25
2.9.1	Totalpräparate	25
2.9.2	Hand- und Semidünnschnitte	26
2.10	Färbungen für die Hellfeldmikroskopie	26

2.11	Vitalitätsfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie	27
2.12	Mikroskopie	27
2.13	Datenverarbeitung	28
3	Ergebnisse	
3.1	Oberflächensterilisation	29
3.1.1	Vitalitätstests mit <i>Chaetomium globosum</i> und <i>C. funicola</i> Ascosporen	29
3.1.1.1	Ascosporenvitalitätstest auf Nitrocellulosemembranen	29
3.1.1.2	Vitalitätstest mit Ascosporen die axenischer Gerste anhaften	32
3.1.2	Nachweis von <i>C. globosum in planta</i> bei Anzucht im MS-Medium	34
3.1.3	Nachweis von <i>C. globosum in planta</i> bei Pflanzenanzucht in steriler Erde	35
3.1.4	Nachweis der Eindringung der Sterilisationsreagenzien in das Pflanzengewebe	36
3.2	Serologischer Nachweis von <i>C. globosum</i>	38
3.2.1	Spezifität und Sensitivität der Antikörper	38
3.2.1.1	PTA-ELISA	38
3.2.1.2	Immunfluoreszenzmarkierung	40
3.2.2	Bestimmung der pilzlichen Biomasse mittels PTA-ELISA	44
3.2.3	Charakterisierung der Interaktion zwischen <i>C. globosum</i> und der Gerste	46
3.2.3.1	TPI	46
3.2.3.2	Immunfluoreszenzmarkierung	48
3.3	Einfluß der <i>C. globosum</i> Besiedlung auf das Pflanzenwachstum	51
3.4	Strukturelle und physiologische Veränderungen der Wurzeln	53
3.5	Einfluß von <i>C. globosum</i> auf den Befall mit <i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	56
3.5.1	Bedeutung der Anzuchtsbedingungen	56
3.5.2	Ursachen der Befallsminderung	57
4	Diskussion	60
4.1	Oberflächensterilisation	60
4.2	Serologischer Nachweis von <i>Chaetomium globosum</i>	63
4.3	Die Interaktion von <i>C. globosum</i> mit der Gerste	66
4.4	Mechanismen der <i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> Befallsminderung	71
5	Zusammenfassung	75
6	Anhang: Liste der verwendeten Abkürzungen	78
7	Literaturliste	79

1 Einleitung

1.1 Die Gerste und ihr Pathogen *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*

Die Gerste gehört neben Weizen, Reis und Mais zu den wichtigsten Kulturpflanzen der Menschheit. In ihrer Bedeutung steht sie bei einer Weltanbaufläche von 717 Mio ha nach Weizen (32 %), Reis (20 %) und Mais (17 %) mit 11 % an 4. Stelle (BECKER et al. 1986). Für den Anbau sind die Faktoren Wasserangebot, Nährsalzversorgung, Temperatur und Bodenbeschaffenheit von ertragsentscheidender Bedeutung. Ebenfalls von Bedeutung sind Pflanzenschutzmaßnahmen und Anbautechniken. Im Pflanzenschutz hat sich in den letzten 25 Jahren gezeigt, daß trotz verstärktem Einsatz von Pestiziden zunehmende Ertragsverluste zu verzeichnen waren (OERKE & SCHÖNBECK 1992). Die Gründe hierfür werden in intensivem Anbau mit hohem Düngeraufwand, im Anbau empfindlicher Hohertragsorten und in unzureichenden Pflanzenschutzmaßnahmen gesucht. Zusätzlich fördert der Anbau in Monokultur bei langjährigem Einsatz des gleichen Fungizids die Resistenzbildung der Pathogene. Ebenso können in Monokulturen die Resistenzgene der Pflanzen eher durch eine Mutation des Pathogens überwunden werden (STEINER & SCHÖNBECK 1995).

Der Echte Mehltau *Erysiphe graminis* gehört zu einer der wichtigsten Pilzkrankheiten im Getreideanbau. Er wird taxonomisch der Klasse der Pyrenomyceten zugeordnet (Ascomycotina, bitunicater Ascus, HAWKSWORTH et al. 1995). Der Pilz ist ein obligat biotropher Parasit. Seine Nährstoffe bezieht er aus den Epidermiszellen der Pflanze über ein speziell ausgebildetes Organ, das Haustorium (Abb. 1 und 3, S. 4). Die forma specialis *hordei* ist besonders in den gemäßigten Breiten von ökonomischer Bedeutung (KOGEL et al. 1994). Sie infiziert die Wintergerste schon im Herbst und damit vor oder während der Bestockung. Entsprechend ist der Schaden durch den Gerstenmehltau vorwiegend durch verringerte Bestandesdichten bedingt (BECKER et al. 1986). Wichtige Faktoren bei der Mehltauabwehr der Gerste sind rassenunspezifische Resistenzgene wie das rezessive Resistenzallel *mlo* (FREIALDENHOVEN et al. 1996). Im Gegensatz dazu wird bei der rassenspezifischen Resistenz die Pflanzenabwehr durch ein komplementäres Avirulenzgen des Pilzes ausgelöst. Die rassenspezifische Resistenz ist somit ein Beispiel für die Gen-für-Gen Hypothese (FLOR 1971). Sie kann besonders leicht durch Mutationen des Pathogens gebrochen werden. Für den Pflanzenschutz sind deshalb eher solche Resistenzfaktoren interessant, die der multiplen genetischen Kontrolle unterliegen und damit eine horizontale Resistenz vermitteln. Ein typisches Beispiel einer solchen horizontalen Resistenz stellt die Stimulation der pflanzeigenen Abwehr durch induzierte Resistenz dar. Sie wird ohne genetische Modifikation der Pflanze wirksam und kann z.B. bei *E. graminis* an Gerste wie bei der

Altersresistenz (CARVER 1987) eine verminderte Haustorieneffizienz und damit einen vermindertes Koloniewachstum des Pathogens hervorrufen (STENZEL et al. 1985).

Neben der Suche nach neuen Resistenzstrategien schreitet auch die Suche nach neuen und wirksameren Fungiziden weiter fort. Beispielhaft konnte dies anhand der fungiziden Wirkstoffgruppe der Strobilurine gezeigt werden. Isoliert wurde sie aus dem Basidiomycet *Strobilurus tenacellus*, einem Waldpilz (ANKE et al. 1977). Um im Wettlauf mit der Resistenzbildung der Pathogene mithalten zu können, beschäftigen sich Arbeiten weltweit mit der fungiziden Wirkung von Pilzmetaboliten. *Chaetomium* stellt eine weitere Pilzgattung dar, die fungizide Substanzen bildet. So wurde in einer vorangegangenen Studie gezeigt, daß eine Saatgutapplikation mit *C. globosum* eine systemische befallsreduzierende Wirkung auf die Infektion mit *E. graminis* hat. Eine Bildung fungizider Substanzen wurde in diesem Zusammenhang diskutiert (VILICH et al. 1998).

1.2 Die Gattung *Chaetomium*

Chaetomium ist eine der größten Gattungen saprotropher Ascomyceten. Seit ihrer Einführung durch Kunze im Jahre 1817 wurden mehr als 300 Arten beschrieben, wovon *C. globosum* eine der geographisch am weitest verbreiteten Arten darstellt (DOMSCH et al. 1993). *Chaetomium*-Arten bilden spezielle Fruchtkörper in Form von Perithezien (Abb. 2, S. 4), die oberflächlich auf dem besiedelten Substrat zu finden sind. Die Perithezien sind rund bis oval und zeichnen sich durch zahlreiche Haare oder Setae aus, die ihre Öffnung, die Ostiole, und das Perithecium als solches umgeben. Die Ostiole ihrerseits entläßt bei Alterung des Peritheciums zahlreiche Ascosporen von arttypischer Größe und Gestalt, die häufig in Form einer Ascosporensäule (Cirrhus) den Fruchtkörper verlassen. Der Kontakt zum Substrat wird durch die Ausbildung von rhizoiden Hyphen, die fest mit dem Substrat verankert sind, hergestellt (Abb. 2). Die Arten der Gattung werden hauptsächlich durch Tiere (von ARX et al. 1986), jedoch auch durch den Wind (JARAI-KOMLODI & TOTH 1993, WICKLOW 1979) verbreitet und sind an den unterschiedlichsten Substraten zu finden, so z.B. auf Dung, Stroh, Papier, Textilien, Pflanzenmaterial und Vogelfedern.

Interessant ist die Gattung hinsichtlich ihrer Fähigkeit organische Substanz umzusetzen. Das Pilzwachstum wird von einer hohen Cellulaseaktivität begleitet, was sich in einer Vorliebe der Pilze für cellulosehaltige Substrate widerspiegelt (AGARWAL et al. 1963). Die Gattung spielt dementsprechend im Kohlenstoffkreislauf der Natur eine wichtige Rolle, insbesondere bei der Zersetzung cellulosehaltiger Materialien (MAGAN & LYNCH 1986) wie z.B. bei der Weichfäule des Holzes (SAVORY 1954).

Darüber hinaus konnte am Beispiel *C. globosum* die Fähigkeit der Pilze zur Nitrifikation in Form einer Nitratbildung aus Pepton bzw. aus Ammonium über Nitrit gezeigt werden, wobei jedoch die Bedeutung dieser pilzlichen Nitrifikation für den Stickstoffkreislauf in der Natur bis heute unklar bleibt (WAINWRIGHT 1992).

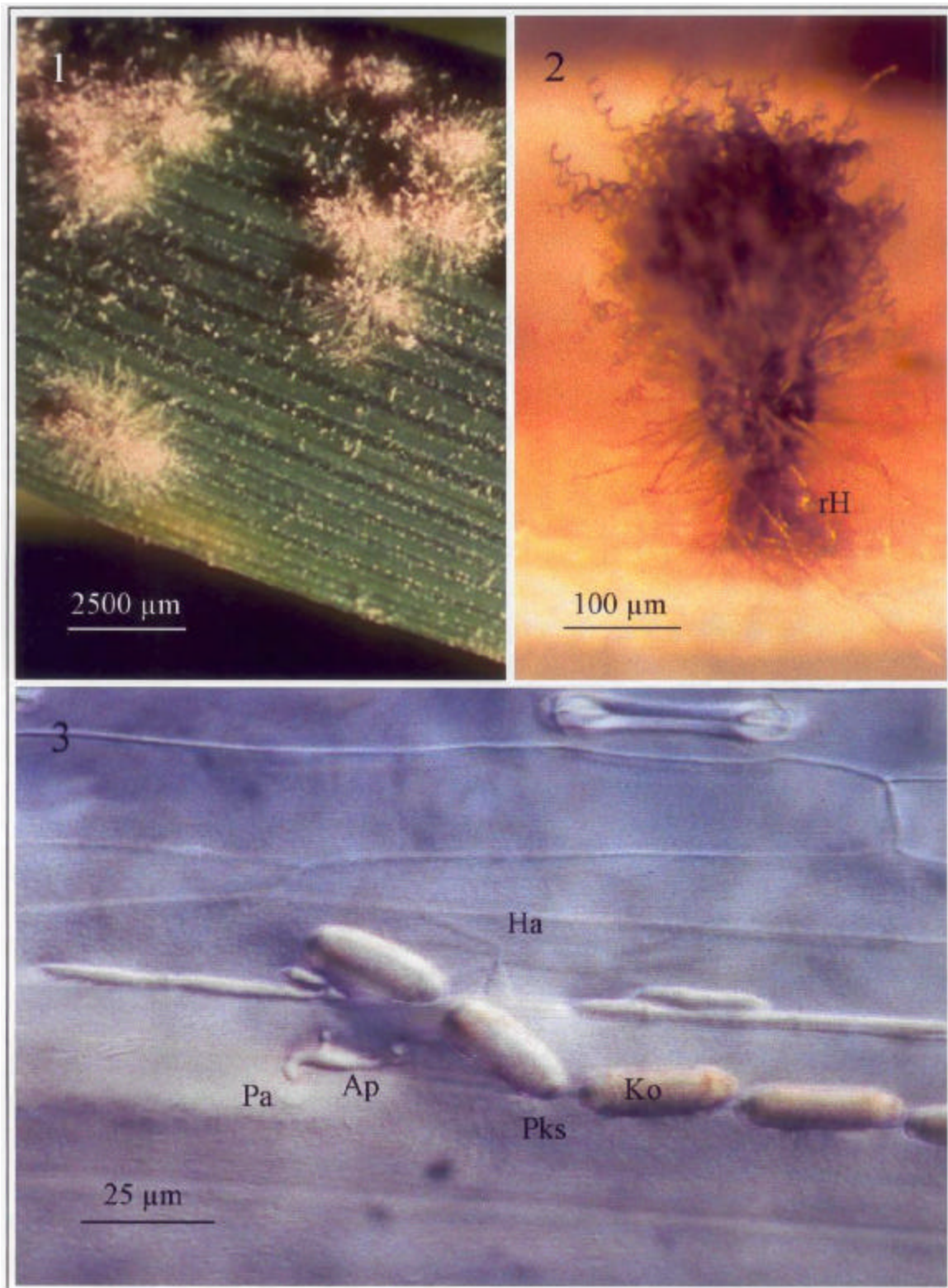
Innerhalb der Gattung sind einige Arten zur Bildung einer Vielzahl toxischer Stoffwechselprodukte fähig. Zu ihnen gehören *C. globosum*, *C. cochliodes* und *C. umbonatum* mit BHT, einem Tetrahydrofuran (DI PIETRO et al. 1992), Cytochalasin (NATORI 1986, UDAGAWA 1984) und Chetomin, einem Piperazin (BREWER et al. 1966 und 1972, BURROWS 1967, BREWER & TAYLOR, 1978). Diese Stoffwechselprodukte wirken toxisch auf Pilze, Bakterien und Tiere (BREWER et al. 1966 und 1972, CHRISTENSEN et al. 1966, DI PIETRO et al. 1992, NATORI 1986). Eine toxische Wirkung auf Pflanzen ist dagegen bisher nicht beschrieben worden.

Abb. 1-3. Wirt, Parasit und Antagonist.

Abb. 1. Infektion eines Gerstenprimärblatts mit *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Die vegetative Vermehrung des Pathogens erfolgt über Konidiosporen, die oberflächlich von konidiogenen Hyphen abgeschnürt werden. Diese bilden gemeinsam mit den Ektomyzel die makroskopisch sichtbare Kolonie (10-fache Vergrößerung).

Abb. 2. Generative Phase von *Chaetomium globosum*. Der Ascomycet bildet Perithezien aus, die oberflächlich das Substrat besiedeln. Zur Verankerung im Substrat werden von den Perithezien rhizoide Hyphen ausgebildet (rH).

Abb. 3. Infektionsphasen von *E. graminis* f. sp. *hordei* ausgehend von einer Konidiospore (Ko). Die charakteristischen Stadien der Infektion sind: 1. die Keimung (Ausbildung des Primärkeimschlauchs, Pks) 2. die Ausbildung eines sekundären Keimschlauchs mit anschließender Appressorienbildung (Ap) und 3. die Haustorienbildung (Ha). Eine der möglichen Mechanismen der Pathogenabwehr ist die Bildung effektiver Papillen (Pa) durch den Wirt.



1.3 Wechselwirkung von *Chaetomium* spp. mit Phytopathogenen

Die befallsmindernde Wirkung einer Behandlung der Pflanzen mit Ascosporen von *Chaetomium* sp. auf verschiedene Phytopathogene wurde durch eine Vielzahl von Studien belegt. Besonders intensiv wurden die Wirkungsmechanismen der Befallsreduktion des Apfelschorfes *Venturia inaequalis* durch eine Behandlung mit *C. globosum* untersucht. In Gewächshausversuchen konnte der Befall von Apfelsämlingen mit *V. inaequalis* bei einer Blattbehandlung der Sämlinge mit einer Ascosporensuspension des Antagonisten um bis zu 90 % reduziert werden (ANDREWS et al. 1983). Unter Feldbedingungen war der Wirkungsgrad einer solchen Behandlung mit bis zu 20 % in zwei aufeinander folgenden Jahren jedoch wesentlich geringer (CULLEN et al. 1984). Als Wirkungsmechanismus lag Antibiose nahe, da wirksame *C. globosum* Isolate Chetomin produzierten. Außerdem war die Wirkung einer Chetomin Applikation bei der Bekämpfung des Apfelschorfs der Wirkung einer Ascosporenapplikation gleichzusetzen (CULLEN & ANDREWS 1984). Weiterführende Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Befallsreduktion führten jedoch zum Schluß, daß eine dauerhafte Bekämpfung des Apfelschorfs mit den Ascosporen von *C. globosum* nicht erreicht werden kann, da es zu einer vernachlässigbar geringen Besiedlung der Apfelblätter durch *C. globosum* und dadurch zu einer fehlenden Nachhaltigkeit der Befallsreduktion kommt. BOUDREAU & ANDREWS (1987) konnten zeigen, daß die leicht flüchtigen antibiotischen Substanzen, u.a. Chetomin, gleichermaßen von abgetöteten und lebensfähigen Ascosporen an die Umgebung abgegeben wurden. Diese Substanzen waren in einem Zeitraum von 1-3 Tagen wirksam. Danach nahm die Wirksamkeit stark ab. Eine wesentlich stärkere Besiedlung der Blätter durch den Antagonisten und eine damit verbundene Nachhaltigkeit einer Minderung des Befalls von *Zygophiala jamaicensis* und *Gloeodes pomigena* an Apfel konnte jedoch durch eine Formulierung der *C. globosum* Ascosporen mit Nährstoffen erreicht werden (DAVIS et al. 1992).

In zahlreichen weiteren Wirt-Parasit-Systemen konnten *C. globosum*, *C. cochliodes* oder andere *Chaetomium* spp. *in vivo* den Befall der Wirtspflanzen durch verschiedene Pathogene reduzieren (Tab. 1).

In allen Untersuchungen waren Applikations- und Wirkort identisch, d.h. für Blattpathogene wurde eine Blattapplikation durchgeführt, für bodenbürtige Pathogene eine Saatgutapplikation oder eine Einarbeitung des Antagonisten in das Topfsubstrat. Als Wirkungsmechanismen wurden toxische Stoffwechselprodukte, Parasitismus, oder Konkurrenz um Besiedlungsort und/oder Nährstoffe untersucht bzw. diskutiert. Eine besondere Rolle wurde dabei in einigen Wirt-Parasit-Systemen den oben beschriebenen Toxinen der Gattung *Chaetomium* zugesprochen.

Tabelle 1. Übersicht verschiedener Wirt-Parasit-Systeme, in denen *C. globosum*, *C. cochliodes* oder andere *Chaetomium* spp. *in vivo* den Befall der Wirtspflanzen durch Pathogene reduzierten

Pathogen	Wirtspflanze	Autoren
<i>Fusarium roseum</i>	Getreide	Chang & Kommedahl 1968
<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>		Hinton & Parry 1993
<i>Fusarium culmorum</i>		Knudsen et al. 1995
<i>Bipolaris sorokiniana</i>		Kommedahl & Chang 1975
<i>Drechslera sorokiniana</i>		Mandal 1999
<i>Septoria tritici</i>		Schoene et al. 1999
<i>Microdochium nivale</i>		Tveit & Moore 1954 Tveit & Wood 1955
<i>Pythium ultimum</i>	Zuckerrübe,	Di Pietro et al. 1991
<i>Rhizoctonia solani</i>	Baumwolle und	Harman et al. 1978
<i>Phoma betae</i>	Kürbis	Walther & Gindrat 1988
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Sojabohne	Pereira & Dingha 1997
<i>Botrytis aclada</i>	Zwiebel,	Elad et al. 1994
<i>Botrytis cinerea</i>	Bohnen und	Köhl et al. 1995 und 1997
<i>Sclerotium cepivorum</i>	Tomaten	Kay & Stewart 1994

In Untersuchungen von VILICH et al. (1995 und 1998) wurde erstmals eine systemische Wirkung von *C. globosum* gegen *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* an Gerste beobachtet. In diesen Arbeiten wurde eine Befallsreduktion des Gerstenmehltaus durch eine Vorbehandlung mit *C. globosum* erreicht. Das Saatgut der mehltauanfälligen Gerstensorte 'Jana' wurde mit Ascosporen des Pilzes inokuliert und nach einer Anzuchtperiode der Befall des nachfolgend applizierten Mehltaus bonitiert. Die Wirkungsmechanismen dieser Befallsreduktion sind bislang unbekannt. Die oben beschriebenen Wirkungsmechanismen Antibiose, Parasitismus oder Konkurrenz können auch für dieses Wirt-Parasit-System diskutiert werden. Weitere Wirkungsmechanismen wären in einer induzierten Resistenz oder in einer Translokation von Pilztoxinen zu suchen. Interessanterweise besitzt *C. globosum* offensichtlich das Potential, symptomlos in der Pflanze zu wachsen. Er wurde aus einer Vielzahl mono- und dicotyler Pflanzen, z.B. den Gattungen *Triticum*, *Zea*, *Vitis*, *Quercus* und *Eucalyptus* (CROUS et al. 1995, FISHER et al. 1992, ESSELN & WELTZIEN 1997, HALMSCHLAGER et al. 1993, BETTUCCI & SARAVAY 1993) als Endophyt isoliert. Unter Endophyten werden in diesem Zusammenhang solche Pilze verstanden, die das Innere des Pflanzengewebes besiedeln, ohne

sichtbare Symptome eines Befalls oder Schadens hervorzurufen (CARROLL 1990). Von der Definition ausgeschlossen werden Pathogene und Mykorrhizapilze (CARROLL 1986), eingeschlossen werden jedoch latente Pathogene (PETRINI 1991).

1.4 Bedeutung einer endophytischen Besiedlung durch Pilze für die Pflanze

Die Besiedlung mit endophytischen Pilzen kann eine tiefgreifende Änderung des physiologischen Zustands der Pflanze bewirken, die sich unter anderem in einer veränderten Interaktion mit Schaderregern ausdrücken kann. Eine solche Veränderung der Interaktion mit Schaderregern ist durch eine Vielzahl von Arbeiten belegt und z.B. an Weidegräsern besonders intensiv untersucht worden. Die endophytische Besiedlung der Gräser der Gattung *Balansiae* bzw. *Neotyphodium* (vormals *Acremonium*) ruft durch die Produktion von Alkaloiden seitens der Endophyten eine negative Wirkung auf "Freßfeinde" (z.B. Weidevieh, Insekten, Nematoden, Pilze) hervor (BACON 1995, BACON & DeBATTISTA 1991, CARROLL 1992, CHRISTENSEN 1996, CLAY 1997, PRESTIDGE & BALL 1997). Ein Schutz vor Insekten bieten ebenfalls die Endophyten *Rhizoctonia parkeri* an Douglasien (CARROLL 1986) und *Phomopsis oblonga* an Ulmen (WEBBER 1981), ausgelöst durch eine pilzliche Toxinbildung. Einen Schutz vor Nematoden, insbesondere *Meloidogyne incognita*, wurde ebenfalls durch eine endophytische Besiedlung von Tomaten durch *Fusarium* spp. erreicht, wobei die Bedeutung einer Toxinbildung für die Nematodenabwehr *in vitro* gezeigt werden konnte (HALLMANN & SIKORA 1994).

Eine Schaderregerabwehr mittels endophytischer Besiedlung durch Pilze kann auch über eine Verstärkung der pflanzlichen Abwehrmechanismen erfolgen. Eine solche verstärkte Abwehrreaktion der Pflanze ist durch Vorinokulation mit schwachen Pathogenen, avirulenten Pathogenen oder Apathogenen ausführlich untersucht worden (ALABOUVETTE et al 1996, STEINER & SCHÖNBECK 1995, VILICH-MELLER & WELTZIEN 1990). Bei einer Besiedlung der Pflanze mit Saprophyten ist einer solchen Abwehrreaktion jedoch bislang wenig Beachtung geschenkt worden (YEDIDA et al. 1999).

Die Etablierung einer endophytischen Lebensweise von apathogenen Pilzen wird durch die taxonomische Verwandtschaft zu Pathogenen erklärt. Die Mechanismen der Kräftegleichgewichte zwischen Wirt und Parasit kommen auch in der Interaktion zwischen Wirt und Endophyt zum tragen (STONE et al. 1994). Interessant ist in diesem Kontext, daß die Etablierung einer endophytischen Beziehung auch durch eine genetische Modifikation des entsprechenden Pathogens ermöglicht werden kann (FREEMAN & RODRIGUEZ 1993, PRUSKY et al. 1994, REDMAN et al. 1999). Weiterhin ist eine symptomlose endophytische Besiedlungsphase bei Pathogenen während der frühen Infektionsphase oder während der Latenzphase ein bekanntes Phänomen (PETRINI 1991, SCHULZ et al. 1998), wobei eine

klärende Zuordnung zu Pathogenen oder Endophyten durch Reinfektionsversuche und/oder durch die Analyse der vegetativen Kompatibilitätsgruppen erfolgt (CORRELL et al. 1987).

Untersuchungen zur Bedeutung einer endophytischen Besiedlung für die Pflanze setzt stets die zweifelsfreie Überprüfung der endophytischen Besiedlung voraus. Eine solche Besiedlung wird entweder durch mikroskopische Techniken oder durch Oberflächensterilisation des zu untersuchenden Gewebes festgestellt. Die zur Oberflächensterilisation verwendeten Reagenzien sind gängigerweise Ethanol und Natriumhypochlorid (NaOCl), die in einer Tauchabfolge bestehend aus Ethanol-NaOCl-Ethanol, gefolgt von mehreren Tauchabfolgen in sterilem Wasser, eingesetzt werden. Die für die Oberflächensterilisation effektive NaOCl Konzentration ist abhängig von der Festigkeit und der Durchlässigkeit des zu untersuchenden Gewebes (BILLS 1996). So wurde z.B. die Oberflächensterilisation von Weizen (*Triticum aestivum*, L.) Blättern und Wurzeln mit einer einminütigen Tauchbehandlung in 95 % Ethanol, gefolgt von 5 min in NaOCl (2 % aktives Chlor) und erneut 0.5 min in 95 % Ethanol durchgeführt (CROUS et al. 1995). Die Effektivität der durchgeführten Oberflächensterilisation wurde ausführlich diskutiert (FISHER et al. 1986, PETRINI 1986, RIESEN & CLOSE 1987) und von PETRINI (1984) anhand von Sporen der Gattung *Sporormiella*, die auf Millipore-Filtern gesammelt und mit den Sterilisationsmitteln behandelt wurden, überprüft. Fortführende Untersuchungen an einem breiten Spektrum verschiedener Pilzgattungen bestätigte die Verlässlichkeit der Methode (FISHER et al. 1991, SCHULZ et al. 1993). Standardisiert eingesetzt wird in neueren Untersuchungen der Abdruck des oberflächlich sterilisierten Gewebestücks auf geeigneten Nährmedien, um die Verlässlichkeit der Oberflächensterilisation zu testen (HALLMANN 1997, SCHULZ 1998). Die chemische Instabilität von NaOCl veranlaßte BILLS (1996) jedoch zur Verwendung von Peressigsäure.

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Darstellung einer Pflanzenschutzstrategie ausgelöst durch ein biologisches Agens. Verwendet wurde hierfür das Wirt-Parasit Modellsystem Gerste-Echter Gerstenmehltau. Die Wege, die die Natur zur Gesunderhaltung der Pflanzen vorgibt, können Phytopathologen als Vorbild bei der Pflanzenzüchtung oder bei der Entwicklung besserer Pflanzenschutzmittel dienen. Im Vordergrund der Arbeit stand deshalb die Untersuchung der Grundlagen der Befallsreduktion und nicht etwa die potentiellen Anwendungsmöglichkeiten von *C. globosum* als biologisches Pflanzenschutzmittel.

Die Untersuchungen sollten daher der Aufklärung der Wirkungsmechanismen dienen, die zur Befallsreduktion von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* an der Gerste bei vorangegangener Saatgut-Applikation von *Chaetomium globosum* führen. Dabei sollte zunächst die Art der

Besiedlung der Gerste mit *C. globosum* analysiert werden, um dann letztendlich die Interaktionen zwischen Antagonist, Pflanze und Pathogen aufzeigen zu können.

Da eine Vielzahl von Pflanzenarten bekannt sind, die *C. globosum* endophytisch besiedelt, war zunächst die Untersuchung einer potentiellen endophytischen Besiedlung auch der Gerste das vorrangige Ziel. Die Oberflächensterilisation ist eine hierfür oft verwendete Methode. Daher sollte die Effektivität einer etablierten Methode zur Oberflächensterilisation überprüft werden und mit der effektiven Methode dann die potentielle endophytische Besiedlung der Gerste mit *C. globosum* untersucht werden.

Darüber hinaus sollte dann die Interaktion zwischen der Gerste und *C. globosum* mittels histologischer Techniken untersucht werden. Da ein Hyphenwachstum *in planta* nur bedingt dem inokulierten Pilz zuzuordnen ist, sollte außerdem eine spezifische Nachweismethode für *C. globosum* entwickelt werden. Eine gute Möglichkeit dafür bietet der Nachweis eines Pilzes mit serologischen Techniken (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA; Tissue Print Immunoblot, TPI; Immunfluoreszenz, IMF). Es galt deshalb einen sowohl spezifischen wie auch sensitiven Antikörper gegen Glycoproteine aus der Zellwand von *C. globosum* herzustellen. Die Produktion dieser Antikörper erfolgte in Kooperation mit der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in der Arbeitsgruppe von Dr. Stephan Winter, Abteilung Pflanzenviren, in Braunschweig.

Die Untersuchung der Interaktion des Antagonisten mit der Pflanze und dem Pathogen auf histologischer Ebene sollte letztlich Hinweise auf die Wirkungsmechanismen der Befallsreduktion liefern. Die Beobachtung des Befallsverlaufs und der Reproduktion von *E. graminis* sollten die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergänzen und die möglichen Wirkungsmechanismen weiter eingrenzen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsorganismen

Als Versuchspilze wurden *Chaetomium globosum* (Kunze) aus der Mikroorganismensammlung der Fa. Novartis, Basel, und *C. funicola* (Cooke) aus der institutseigenen Mikroorganismensammlung (Hallmann 1994) verwendet.

Als Versuchspflanze diente Wintergerste, *Hordeum vulgare*, cv. 'Jana'. Die Sorte ist durch das Mehltau-Resistenzgen *MILa* ausgezeichnet, welches jedoch keinen ausreichenden Mehltauschutz mehr vermittelt. Die Pflanzen werden gemäß der beschreibenden Sortenliste (ANONYM 1999) bundesweit mäßig stark befallen.

Erysiphe graminis f. sp. *hordei* (Em. Marchal), der Erreger des Echten Mehltaus an Gerste, wurde auf 3-4 Wochen alten Gerstenpflanzen (c.v. 'Jana') im Gewächshaus erhalten.

2.2 Pflanzenanzucht

Die Pflanzenanzucht erfolgte entweder axenisch oder in unsteriler Felderde. Die axenische Kultur der Gerste in Murashige und Skoog (MS) - Nährmedium mit oder ohne *Chaetomium globosum* diente der Ausschaltung störender Einflüsse biotischer (Pathogene, konkurrierende Mikroorganismen) und abiotischer (Wasserstress) Natur. Durch diese Kultur konnte außerdem bei histologischen Untersuchungen eine pilzliche Besiedlung eindeutig *C. globosum* zugeordnet werden. Die Anzucht in Felderde hingegen sollte die Interaktionen zwischen Pilz, Pflanze und Pathogen *in vivo* darstellen. Eine weitere Variante, die Anzucht in steriler Felderde, diente dem Vergleich der Intensität der pilzlichen Besiedlung bei Bodenbedingungen unter völliger Konkurrenzfreiheit mit der bei Bodenbedingungen unter Konkurrenzdruck durch Anwesenheit einer Mikroorganismenflora.

2.2.1 Pflanzenanzucht in Murashige und Skoog (MS) - Kultur mit bzw. ohne *Chaetomium globosum*

Für die Pflanzenanzucht in MS-Kultur wurden Karyopsen entpelzt und mittels 1 minütigem Schütteln in 1 % Tween 20, gefolgt von 5 minütiger Inkubation in 95 % Ethanol und nachfolgend 25 minütiger Inkubation in NaOCl (9 % aktives Chlor) oberflächensterilisiert. Nach 3 Waschschritten in sterilem Wasser wurden die Körner auf PDA ausgelegt und während der folgenden Tage auf Kontaminationen kontrolliert. Nach 3 Tagen erfolgte die Übertragung der axenischen Keimlinge in Teströhrchen (Ø 3 cm, Schott, Mainz), die mit je 15 ml

Murashige und Skoog Nährsalzmedium (MS-Medium; Sigma M 5524, 1 % Agar, 2 % Saccharose; pH 6.0) befüllt waren. In der behandelten Variante erfolgte dann die Inokulation mit *C. globosum*. Der Boden der Teströhrchen wurde mit Aluminiumfolie bis zur Agaroberfläche abgedunkelt, um den Lichteinfall zu verringern und damit die Induktion der Photosynthese in den Wurzeln zu verhindern. Die Öffnungen der Röhrchen wurden mit Wattestopfen verschlossen. Die Inkubation der Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer (16 °C, 16 h Licht bei einer Beleuchtungsstärke von 8000 lx). Ein Tag vor der Inokulation mit *E. graminis* wurden 30 axenische Pflanzen in der Kontrolle und 30 ausschließlich mit *C. globosum* besiedelte Pflanzen in der behandelten Variante vorsichtig aus den Teströhrchen genommen und in ein Topfgefäß (60cm lang, 15 cm breit) in Klasmann 'Seedling Substrat' (Klasmann, Geste-Groß Hesepe) getopft und ins Gewächshaus transferiert. Die Trennung zwischen behandelter Variante und Kontrolle erfolgte mittels einer Plastikfolie in Längsrichtung des Gefäßes. Die Gewächshaus Temperatur wurde über die Heizung (20 °C) und die Lüftung (24 °C) gesteuert. Die Tageslänge von 16 h wurde bei kürzeren Tagen durch Zusatzlicht (8000 lx) gewährleistet.

2.2.2 Pflanzenanzucht in Felderde mit bzw. ohne *Chaetomium globosum* Inokulum

Für die Pflanzenanzucht in unsteriler Felderde wurden die Karyopsen wie oben beschrieben oberflächensterilisiert, um sautgutbürtige Pathogene abzutöten. Die Aussaat von 50 Karyopsen je Behandlung erfolgte in ein Felderde-Sand-Gemisch (3:1, v/v). Die Felderde entstammte dem A-Horizont einer Braunerde des Versuchsguts Kleinaltdorf der Universität Bonn. Für die Untersuchungen in steriler Erde wurde das gleiche Felderde-Sand-Gemisch zweimal für 1 h autoklaviert, wobei der zweite Sterilisationsschritt 24 h nach dem ersten erfolgte. Alle für die Aussaat notwendigen Materialien wurden mit Ethanol desinfiziert und die Erde stets mit einer Plastikfolie abgedeckt. Die Anzucht in den Topfgefäßen in der Klimakammer erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei der axenischen Pflanzenanzucht (s. 2.2.1). Die Pflanzen wurden auch hier 1 Tag vor Mehltauinokulation ins Gewächshaus transferiert. Mit den Pflanzen aus der Anzucht in steriler Erde wurden keine Untersuchungen zur Mehltau-Befallreduktion durchgeführt, da sich diese Pflanzen bereits in der Anzuchtsphase durch eine sehr starke Wachstumsdepression auszeichneten. Diese Pflanzen wurden deshalb nur für die Untersuchung der Besiedlung mit *C. globosum* verwendet.

In allen Experimenten wurden nur gleichmäßig entwickelte Gerstenpflanzen im Alter von 14 Tagen verwendet.

2.3 Inokulum der Pilze und Inokulation

Chaetomium globosum und *C. funicola*

Der Ascomycet wurde bei 20 °C auf Strohagar aus 2 g Weizenstroh und 1.5 % Agar kultiviert. Das Weizenstroh wurde hierfür durchfeuchtet und in Glaspetrischalen autoklaviert. Nach Abkühlung wurden 15 ml sterilisierter Wasseragar hinzugegeben und das Stroh mit dem Agar gut vermischt. Dieses Medium verhinderte die für Vollmedien, insbesondere MEA, typische Degeneration des Pilzes, die sich morphologisch in einer sehr reduzierten Perithezienbildung äußert. Zudem förderte es stark die Bildung von Ascosporen, die als Inokulum dienten.

Die Ascosporensuspension wurde durch Überstauen einer Petrischale mit 50 ml einer 0.85 %igen Kochsalzlösung und nachfolgendem Mörsern der Perithezien gewonnen. Perithezienhaare und Teile der Perithezienwand wurden durch Filtern der Suspension durch eine Baumwollgaze abgetrennt. Die gewonnene Ascosporensuspension diente der Inokulation der axenischen Kultur und der Kultur in Felderde. Für die Ascosporenvitalitätstests auf Nitrocellulosemembranen und Tauchbehandlung axenischer Pflanzen (Versuche zur Effektivität der Oberflächensterilisation) wurde die Ascosporensuspension auf genau 10^6 Ascosporen pro ml eingestellt.

Für die Inokulation der MS-Kultur wurde die Sporensuspension vor der Übertragung der 3 Tage alten axenischen Keimlinge in die Teströhrchen mit 2 %igem lauwarmen Agar 1:1 (v/v) verdünnt. Es wurden dann 0,5 ml der lauwarmen verdünnten Ascosporenlösung (ca. 10^4 Ascosporen) auf die Oberfläche des Mediums aufgetropft. Nach Erstarren des Agars wurden dann die Keimlinge eingesetzt. Die Keimlinge der Kontrolle wurden auf die gleiche Menge der mit Agar versetzten Kochsalzlösung gesetzt. Für die Anzucht in Felderde erfolgte die Inokulation der oberflächensterilisierten Karyopsen über eine Tauchbehandlung in der Ascosporensuspension, so daß in etwa 10^4 - 10^5 Ascosporen einem Korn anhafteten. Die inokulierten Körner, wie auch die in Kochsalzlösung getauchten Körner der Kontrolle, wurden 1 cm tief ausgesät.

Erysiphe graminis f. sp. *hordei*

Die Inokulation mit *E. graminis* f. sp. *hordei* wurde in einer Wirbelkammer durchgeführt. Ungefähr 80 stark infizierte Pflanzen aus der Erhaltungskultur dienten als Inokulumsquelle. Es wurden maximal 24 h alte Konidien verwendet. Ältere Konidien wurden durch Abschütteln einen Tag vor Versuchsbeginn entfernt. Für alle Versuche wurden ausschließlich die Primärblätter der Gerste verwendet. Die Blätter wurden mit Hilfe kleiner Magnete und eines Gerüsts horizontal fixiert, so daß ausschließlich die Blattoberseite, die adaxiale Seite, inokuliert

wurde. Um möglichst natürliche Infektionsbedingungen zu bieten, wurden Konidien von infizierten Pflanzen mit einem Rotor (Laufzeit 1 min) gleichmäßig aufgewirbelt und dadurch die Versuchspflanzen inokuliert. Die Inokulumdichte wurde anhand ausgelegter Objektträger mikroskopisch bestimmt. Sie lag bei Versuchen zur Bewertung der Befallsreduktion bei ungefähr 100 Konidien pro cm^2 . Für die mikroskopischen Untersuchungen zur Bewertung der Pathogenentwicklung (s. 2.4) wurde eine wesentlich höhere Inokulumdichte benötigt, weshalb die Inokulation durch zusätzliches manuelles Schütteln der infizierten Pflanzen unterstützt wurde. Die Inokulumdichte lag hier bei ungefähr 700 Konidien pro cm^2 . Nach der Inokulation verblieben die Pflanzen noch 3-4 h in der Wirbelkammer, bevor die Magnete entfernt und die Pflanzen ins Gewächshaus zurückgestellt wurden. Auf der Oberseite der Primärblätter entwickelten sich so bei Bewertung der Befallsreduktion ungefähr 30 und bei Bewertung der Pathogenentwicklung ungefähr 150 Kolonien.

2.4 Bewertung des Befallsverlaufs von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*

Die Untersuchung des Befallsverlaufs erfolgte an Pflanzen aus MS-Kultur.

2.4.1 Entwicklung und Konidienanhaftung von *Erysiphe graminis*

Zur Bewertung der Entwicklung von *E. graminis* wurden folgende Infektionsstadien mikroskopisch untersucht: 1) die Bildung des Primärkeimschlauchs der Konidien und damit die Konidienkeimung, 2) die Bildung von Appressorien und 3) die erfolgreiche Penetration, dargestellt als Prozentwert der Appressorien mit Haustorien (ZEYEN et al. 1995). Ebenfalls festgehalten wurde die Konidiendichte und damit die Konidienanhaftung auf den für die Mikroskopie aufbereiteten Blättern. Zusätzlich wurde die Autofluoreszenz der befallenen Epidermiszellen mittels eines Epifluoreszenz Filtersystems (Leica D Filtersystem mit einem Anregungsfilter mit maximalem Durchlass bei 355-425 nm, einem Teilerspiegel mit Durchlass über 455nm und einem Sperrfilter mit maximalem Durchlass bei 470 nm) untersucht (ZEYEN et al. 1995). 41 h nach Inokulation wurden 10 Primärblattstücke von jeweils 5 cm Länge pro Behandlung entnommen und für die Mikroskopie aufgearbeitet. Auf jedem Blattstück wurden 100 Konidien auf ihre Keimung hin untersucht und wiederum 100 gekeimte Konidien auf die Bildung von Appressorien. Die Autofluoreszenz der Epidermiszellen wurde an 60 Penetrationsstellen überprüft und mit (0) (keine Autofluoreszenz) bzw. (1) (leichte Autofluoreszenz) bewertet. Die Bildung von Primärhaustorien wurde anhand von 50 gekeimten Konidien mit Appressorien bestimmt. Die Konidiendichte ergab sich als Anzahl der nach Inokulation, Ernte und Aufarbeitung der Blätter vorhandenen Konidien pro cm^2 Blattfläche. Für diese Untersuchung wurde die gesamte Blattoberfläche ausgewertet.

2.4.2 Reproduktion von *Erysiphe graminis*

Die Sporulation und damit die Reproduktion von *E. graminis* wurde anhand von 7 Primärblättern von 5 cm Länge 8 Tage nach Inokulation untersucht. Die Blätter wurden dazu in verschließbaren Teströhrchen (\varnothing 3 cm) mit je 1 ml Leitungswasser bei der für die Sporulation optimalen Temperatur von 20 °C bei 8000 lx Kunstlicht für 48 h inkubiert. Die gebildeten Konidien wurden unter Zugabe von 1 ml einer 0.5 %igen Tween 20 Lösung durch Schütteln auf dem Vortexer abgespült und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Errechnet wurde aus diesen Werten die Sporulationskapazität der einzelnen Kolonien.

2.5 Bewertung der Pflanzenentwicklung

Die Bewertung der Pflanzenentwicklung erfolgte an Pflanzen aus MS-Kultur und an Pflanzen aus Anzucht in steriler Erde (mit bzw. ohne *C. globosum* Inokulum). Die Frischgewichtsdaten der Pflanzen aus MS-Kultur wurden vor der Auspflanzung und damit vor der Mehltauinokulation von jeweils 30 Pflanzen erhoben. Da diese Pflanzen grundsätzlich für Untersuchungen der Befallsreduktion von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* verwendet wurden, liegen hier nur die Frischgewichte ganzer Pflanzen vor. Die *C. globosum* Besiedlung der Gerste zeigte keinen eindeutigen Einfluß auf das Pflanzenwachstum in unsteriler Felderde, weshalb die Daten in die hier vorliegenden Untersuchungen nicht mit einbezogen wurden. Je 10 Pflanzen aus MS-Kultur wurden außerdem zur Analyse der Wurzellänge, des Volumens und des Durchmessers mittels eines Wurzelscanners (AGFA, Köln) herangezogen. Die Datenverrechnung erfolgte anhand des Programmes Winrhizo (Régent Instruments, Blain, Canada).

2.6 Oberflächensterilisation

Die Oberflächensterilisation dient der schnellen und einfachen Bestimmung der Gewebeteile, die vom Pilz inter- oder intrazellulär besiedelt werden. Zunächst wurde die Verlässlichkeit verschiedener Sterilisationsmittel getestet, Ascosporen von *C. globosum* abzutöten. Dabei kam ein sog. Ascosporenvitalitätstest auf Nitrocellulosemembranen zum Einsatz, bei dem die Sporen den Sterilisationsmitteln Ethanol, Natriumhypochlorid (NaOCl) und Peressigsäure direkt ausgesetzt wurden und die unterschiedlichen Inkubationszeiten mit den Sterilisationsreagenzien durch Absaugen der Lösungen erreicht wurden (PETRINI 1984).

In einem weiteren Test, dem sog. Vitalitätstest für Ascosporen die axenischen Gerstenpflanzen anhaften wurden die effektiven Sterilisationsmittel des ersten Tests erneut überprüft. Dafür wurden axenische Pflanzen in eine *C. globosum* Ascosporensuspension getaucht und danach die Wirksamkeit der verschiedenen Oberflächensterilisationsmittel *ad planta* getestet.

Die Konzentrationsbestimmung der des UV- und Wärmeempfindlichen aktiven Chlors in der NaOCl-Lösung erfolgte nach BIANCO et al. (1978) mittels der Thiosulfat-Titration. Die eingesetzten Konzentrationen der chemisch stabileren Peressigsäure wurden aus der 39 %igen Ausgangslösung immer frisch angesetzt.

2.6.1 Ascosporenvitalitätstest auf Nitrocellulosemembranen

Für den Ascosporenvitalitätstest auf Nitrocellulosemembranen wurden 10^6 Ascosporen von *Chaetomium globosum* bzw. *C. funicola* in eine Vakuumfiltrationseinheit (Sartorius, Göttingen) auf eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 1,2 μm , Millipore, Eschborn) gegeben. Die Tauchbehandlung der Sporen erfolgte dann in einer Abfolge von 95 % Ethanol, NaOCl in verschiedenen Konzentrationen (0,7; 2; 3,5 und 9 % aktivem Chlor) und erneut 95 % Ethanol. Zusätzlich wurde statt NaOCl Peressigsäure (5 % und 10 %, v/v) als oxidierendes Reagenz untersucht. Die Einwirkzeiten der verschiedenen Reagenzien wurde wie folgt variiert:

- 1) 1 min Ethanol, 5 min oxidierendes Reagenz, 0,5 min Ethanol
- 2) 5 min Ethanol, 5 min oxidierendes Reagenz, 0,5 min Ethanol
- 3) 5 min Ethanol, 15 min oxidierendes Reagenz, 5 min Ethanol

Zum Abschluß der Tauchbehandlung wurde das den Sporen anhaftende Ethanol durch dreimaliges Spülen mit sterilem Leitungswasser entfernt. Der Filter mit den aufliegenden Sporen wurde dann mit der Oberseite auf PDA (pH 5,1; Difco) gedrückt, wodurch die Mehrzahl der Sporen auf die Agaroberfläche übertragen wurde. Zur Kontrolle wurden die Sporen ausschließlich mit sterilem Leitungswasser behandelt. Die Bestimmung der Sporenkeimung erfolgte mikroskopisch durch Auszählen von 2000 Sporen pro Nitrocelluloseabdruck nach folgenden Inkubationszeiten (20 °C im Dunkeln): Kontrolle: *C. globosum* nach 15 h, *C. funicola* nach 18 h; Behandlung: *C. globosum* nach 24 h, *C. funicola* nach 30 h. Diese gestaffelten Inkubationszeiten waren durch die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten beider Pilzarten und die Keimungsverzögerung, die aus der Behandlung mit den Sterilisationsreagenzien resultierte, notwendig. Jedes Experiment wurde einmal wiederholt. Als eine erfolgreiche Keimung wurde angesehen, wenn der Keimschlauch der Ascosporen die doppelte Länge des Ascosporendurchmessers aufwies.

2.6.2 Vitalitätstest für Ascosporen die axenischen Gerstenpflanzen anhaften

Der Vitalitätstest für Ascosporen die axenischen Gerstenpflanzen anhaften erfolgte mittels axenischer Blätter und Wurzeln von 10 Pflanzen je Tauchbehandlung. Die Inokulation ganzer Pflanzen mit Ascosporen von *Chaetomium globosum* bzw. *C. funicola* erfolgte durch einmaliges Tauchen in eine Sporensuspension mit 10^6 Ascosporen pro ml. Nach einminütiger

Trocknungsphase wurden 5 cm lange Blattstücke und das gesamte Wurzelsystem einer der folgenden Tauchbehandlungen, abgeleitet aus den Ergebnissen des Ascosporenvitalitätstests auf Nitrocellulosemembranen (s. 2.6.1), unterzogen:

Tauchbehandlung N-3,5: 1 min Ethanol; 5 min 3,5 % NaOCl; 0,5 min Ethanol

Tauchbehandlung N-9: 1 min Ethanol; 5 min 9 % NaOCl; 0,5 min Ethanol

Tauchbehandlung P-10: 1 min Ethanol; 5 min 10 % Peressigsäure; 0,5 min Ethanol

Nach der Tauchbehandlung wurde das den Pflanzen anhaftende Ethanol durch dreimaliges Spülen in sterilem Leitungswasser entfernt. Die Zerteilung jeder Pflanze erfolgte in 25 Blatt- bzw. Wurzelstücke von 1 cm Länge. Die Schnittstellen wurden dabei verworfen, da die Sterilisationsmittel dort in das Gewebe eindringen konnten. Die Gewebestücke wurden auf 10 % PDA (w/v; pH 5,1; Difco) ausgelegt und die pilzliche Besiedlung der Gewebestücke täglich mit Hilfe eines Binokulars unter 10 facher Vergrößerung bonitiert. In der Negativkontrolle wurde die axenische Eigenschaft der Versuchspflanzen überprüft. Dafür wurden Pflanzen aus axenischer Anzucht verwendet, wobei diese ohne weitere Behandlung in Stücke gleicher Größe und Anzahl geschnitten wurden. Die Inkubation und Bonitur dieser Gewebestücke erfolgte wie oben beschrieben. Für die Positivkontrolle wurden mit Ascosporen inokulierte Pflanzen, die keiner Sterilisationsbehandlung unterzogen wurden, auf PDA ausgelegt und wie oben beschrieben inkubiert und bonitiert.

2.6.3 Nachweis von *Chaetomium globosum* in planta mittels Oberflächensterilisation

Die Überprüfung der endophytischen Besiedlung von Gerste mit *C. globosum* erfolgte mittels der im Abschnitt 2.6.2 beschriebenen Tauchbehandlung P-10. Dafür wurden 8 Pflanzen aus der axenischen MS-Kultur und 8 Pflanzen aus der MS-Kultur mit *C. globosum* Inokulum verwendet. Pro Pflanze wurden nach der Tauchbehandlung P-10 je 25 Wurzel- und je 15 Blattsegmente untersucht. Die Gewebeselemente wurden wie schon oben beschrieben auf 10 % PDA ausgelegt und das Pilzwachstum aus den Segmenten in einem Zeitraum von 7 Tagen bonitiert.

2.7 Herstellung der Antikörper

2.7.1 Extraktion von Pilzantigenen zur Immunisierung von Versuchstieren

Pilzantigene stellen i.d.R. hochkomplexe Mischungen von extra- und intrazellulären Proteinen oder von Strukturproteinen dar, die eine Vielzahl von Immunantworten hervorrufen können. Nicht nur Proteine oder Glycoproteine können als Antigene fungieren, sondern auch Polysaccharide oder Lipopolysaccharide. Für die Herstellung von Antigenpräparaten war

zunächst wichtig, welche Pilzfraktionen zur Immunisierung genutzt werden sollten. Oberflächenantigene, die in der pilzlichen Zellwand, auf Hyphen oder auf Sporen lokalisiert sind, wären für die mikroskopische Untersuchungen gut geeignet, da intaktes Pilzmyzel markiert werden kann und die Antigen/Antikörperreaktion auf der Pilzoberfläche stattfindet.

Die Gewinnung dieser Bestandteile erfolgte mit leichten Modifikationen, nach DEWEY et al. (1989). Ausgangsmaterial war eine Einsporkultur von *C. globosum* und *C. funicola* (KREISEL & SCHAUER 1987), die für die weiteren Experimente herangezogen wurde. Die Anzucht der Pilze erfolgte über einen Zeitraum von 10 Tagen auf MEA.

Zur Gewinnung der Oberflächenantigene wurde die mit *C. globosum* bzw. *C. funicola* bewachsene Petrischale mit 5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; 0,8 % NaCl, 0,02 % KH_2PO_4 , 0,115 % Na_2HPO_4 , 0,02 % NaN_3 ; w/v; pH 7,4) überstaut und das Luftmyzel mittels eines Gummispatels vorsichtig abgeschabt. Unter Zugabe eines weiteren ml PBS erfolgte die Überführung des Myzels in einen Metall-Zentrifugenbecher. Nach Zentrifugation bei 10000 x g und 4 °C für 5 min (Beckmann Avanti J-25, München) wurde der Überstand dekantiert und das Pilzsediment verworfen. Die PBS löslichen Polypeptide, Glycoproteine und Polysaccharide wurden mit eiskaltem Aceton (70 %, v/v, in der Endkonzentration) über Nacht bei 4 °C gefällt und das Präzipitat mittels Zentrifugation (2500 x g, 30 min, 4 °C) gewonnen. Der acetonhaltige Überstand wurde verworfen und das Pellet entweder bei 37 °C oder Raumtemperatur (ca. 20 °C) getrocknet. Die so gewonnenen Myzel-Oberflächenfraktion der Pilze wurde in PBS aufgenommen und eine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt (BRADFORD 1976 für die Immunisierung; LOWRY et al. 1952 für die Bestimmung der Nachweisgrenze).

2.7.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

Die auf 100 µg Protein eingestellten Pilzprotein-Präparate wurden als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Hierfür wurde die Proteinlösung 1:1 (v/v) mit Freund's Adjuvants (incomplete) vermischt und die Emulsion dann intramuskulär in den hinteren Oberschenkelmuskel verabreicht. Die Immunisierung wurde dreimal in Abständen von 10 Tagen wiederholt. 4 Wochen nach der letzten Immunisierung erfolgte eine sog. Booster-Injektion, um die Immunantwort im Kaninchen noch einmal zu verstärken.

Die erste Blutabnahme wurde 1 Woche nach der 3. Immunisierung durchgeführt. Hierfür wurde die laterale Ohrvene des Kaninchens mit einer Rasierklinge vorsichtig in Längsrichtung eingeritzt und das austretende Blut in einem Reagenzglas gesammelt. Das so gewonnene Blut (10-15 ml) wurde zur Senkung der festen Bestandteile für 8 Stunden bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) und dann über Nacht bei 4 °C zur vollständigen Koagulation der Zellen inkubiert. Das

Antiserum wurde durch Abzentrifugieren der festen, koagulierten Bestandteile des Bluts gewonnen.

Die Aufbereitung der Antiseren, die Herstellung von Immunglobulinen aus den Rohseren und die Konjugation von Immunglobulinen an alkalische Phosphatasmoleküle erfolgte nach HARLOW & LANE (1988).

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Reaktion und die Spezifität der polyklonalen Antikörper geprüft. Hierbei konnte festgestellt werden, daß sich der Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA) nicht für den Nachweis des Pilzantigens eignet und deshalb eine direkte Methode, der Plate Trapped Antigen ELISA (PTA-ELISA) für die serologischen Voruntersuchungen zu verwenden war.

Obwohl polyklonale Antikörper erfolgreich in ELISA-Tests oder Dot-Blot Verfahren zum Nachweis von bestimmten Pilzen in Pflanzen eingesetzt wurden (BECKMANN et al. 1994; BELLO et al. 1996; HARRISON et al. 1990; NEWTON & REGLINSKI 1993; RICKER et al. 1991), zeigten die Voruntersuchungen zum Nachweis von *Chaetomium* spp., daß die gewonnen Antiseren gegen *C. globosum* und *C. funicola* auch mit Pilzen anderer Gattungen, aber auch mit Pflanzenkonstituenten reagieren. Diese Kreuzreaktionen können manchmal durch Adsorption reduziert werden. Versuche zur Präzipitation von ungewünschten Serumkomponenten durch Vorinkubation von Rohserum mit Pflanzenhomogenaten oder mit heterologen Pilzpräparaten resultierten in einer stark verminderten Reaktivität des Antiserums. Eine Erhöhung der Spezifität war nicht festzustellen (KARPOVICH-TATE et al. 1998).

Deshalb sollten monoklonale Antikörper produziert werden, um hochspezifische Antikörper durch Selektion geeigneter Hybridoma-Zelllinien zu gewinnen.

2.7.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

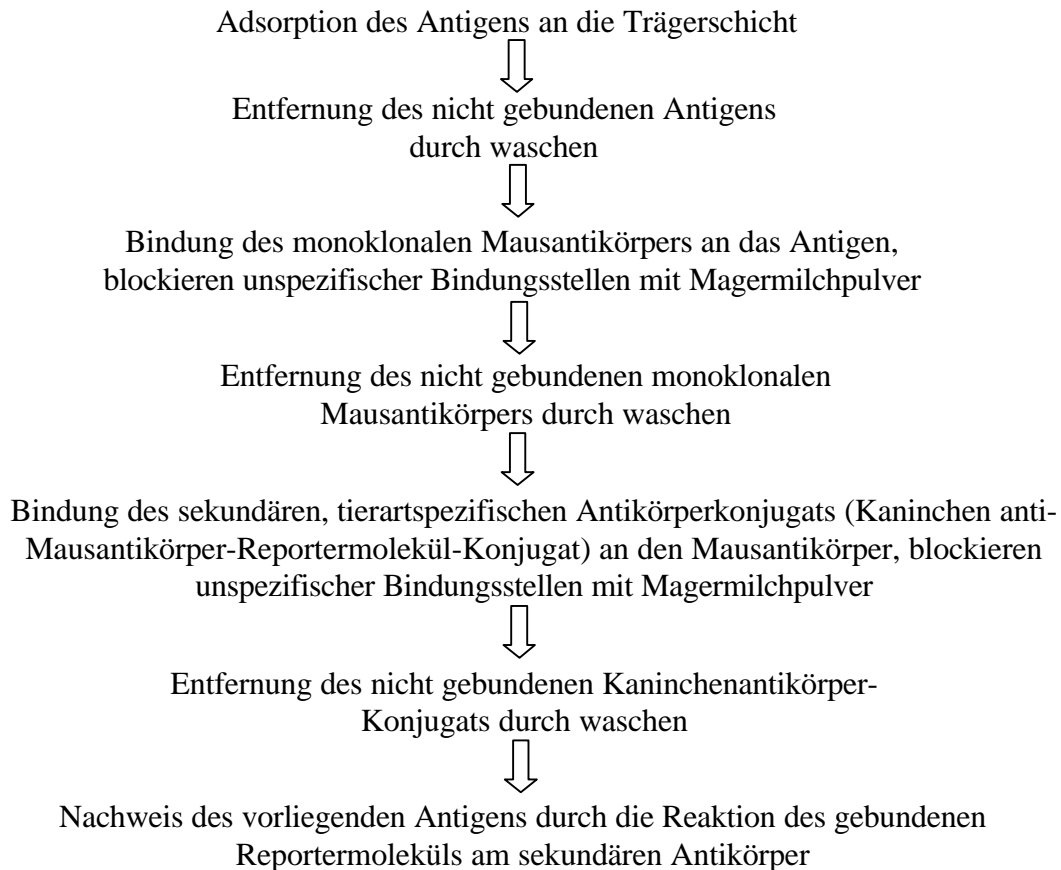
Die Methode zur Herstellung der monoklonalen Antikörper entsprach im wesentlichen der Methode von PETERS & BAUMGARTEN (1992) und den in der DSMZ Abteilung Pflanzenviren gebräuchlichen Labortechniken zum sterilen Arbeiten und der Zellkultur.

Aus 3 unabhängigen Fusionsexperimenten wurden Hybridoma-Zelllinien gewonnen und aus einer Vielzahl von *Chaetomium* spp. positiven Antikörpern drei Zelllinien, 2C12-A7-E6, 1-2C12-F12-G2 und 1-2C12-F12-H2 selektiert, die für die weiteren Arbeiten genutzt wurden.

2.8 Serologische Nachweismethoden von *C. globosum*

Verschiedene serologische Verfahren wurden für den spezifischen Nachweis von *C. globosum* und für die Lokalisierung des Pilzes im Pflanzengewebe genutzt. Für die Untersuchungen wurden die Nachweismethoden PTA-ELISA, TPI und IMF herangezogen.

Die allen drei Methoden zugrundeliegende Vorgehensweise zum Nachweis des Antigens gliedert sich in folgende Arbeitsschritte:



2.8.1 Plate Trapped Antigen (PTA)-ELISA

Anhand eines PTA ELISA wurde sowohl die Spezifität als auch die Nachweisgrenze (Sensitivität) des monoklonalen Antikörpers (MAK) ermittelt. Der Antigennachweis erfolgte nach Bindung des MAK an das Antigen indirekt durch einen sekundären Antikörper. Dazu wurde ein tierartspezifischer Antikörper, hier ein in Kaninchen gegen Mäuse gebildetes Immunglobulin G (RAM-IgG) verwendet, das über eine Konjugation mit dem Enzym alkalische Phosphatase (RAM-IgG-ap) die Nachweisreaktion durch Hydrolyse des Substrats p-Nitrophenylphosphat hervorruft.

Im PTA-ELISA wurde das Pilzantigen direkt an die Polystyrolschicht der Mikrotiterplatte (96 Flachbodenkavernen mit 0,4 ml Fassungsvermögen, Greiner, Nürtingen) adsorbiert. Nach dem Blockieren der freien Bindungsstellen werden die primären, pilzspezifischen Antikörper an die immobilisierten Pilzantigene gebunden. Die spezifisch gebundenen monoklonalen Antikörper werden dann mittels der sekundären Kaninchen-Antikörperkonjugate nachgewiesen, deren Bindung durch die Reaktion mit dem Substrat proportional zur Menge des gebundenen sekundären Antikörpers ist. Das Resultat ist eine Bildung von wasserlöslichem, gelbem Nitrophenol, die in gewissen Grenzen quantifiziert werden kann.

In den ELISA-Tests wurden die Kulturüberstände drei verschiedener monoklonaler Zelllinien eingesetzt: 1-2C12-A7-E6, 1-2C12-F12-G2 und 1-2C12-F12-H2. Die Antikörperkonzentration in den Kulturüberständen betrug ca. 30 µg pro ml Kulturüberstand.

Als Negativkontrolle wurde PBS statt des Pilzantigens in je zwei Kavernen pipettiert, um unspezifische Bindungen der IgG-Lösungen an das Polystyrol zu erfassen. Da die Randreihen von Mikrotiterplatten unspezifische Reaktionen zeigen können, wurden für die Proben und die Negativkontrolle nur die inneren Vertiefungen der Platte verwendet. Aus den Readereinzelnwerten in Form zweier Wiederholungen wurde durch das Programm Base (SLT, Crailsheim) direkt der Leerwert abgezogen und der Mittelwert gebildet. Proben, deren Extinktionswert über einer Extinktion von 0,2 lag, wurden als positiv angesehen.

Einzelschritte des ELISA-Tests

- ① Anzucht der Pilze auf MEA. Extraktion von Pilzantigenen verschiedener Pilze durch Zugabe von 3 ml PBS plus Tween (PBST; PBS, 0,05% Tween 20; v/v) zur Petrischale, abschaben und mörsern des Luftmyzels und Abnahme des zellfreien Überstands
- ① Zugabe von 100 µl *C. globosum* Pilzantigen in verschiedenen Proteinkonzentrationen gelöst in PBS (Bestimmung der Nachweissensitivität) bzw. Zugabe von 100 µl unverdünnten Pilzantigenen verschiedener Gattungen in PBST (Bestimmung der Nachweisspezifität). Inkubation der Platten über Nacht bei 4 °C, danach 3 x spülen mit PBST: Die Platten werden mit einer Spritzflasche gespült und zwischen den Spülschritten gründlich ausgeklopft
- ② Zugabe von 200 µl MAK-Kulturüberstand, 1:10 verdünnt in Blockierungspuffer (PBST plus 2 % Magermilchpulver, w/v), Inkubation der Platten über Nacht bei 4 °C, danach 3 x spülen mit PBST
- ③ Zugabe von 100 µl sekundärer Kaninchen-Antikörperkonjugate (RAM-IgG-ap, 1 mg Protein pro ml, DSMZ) 1:1000 verdünnt in Blockierungspuffer, Inkubation der Platten über Nacht bei 4 °C, danach 3 x spülen mit PBST

- ④ Zugabe von 200 µl p-Nitrophenylphosphat (Merck) in Substratpuffer. Konzentration: 0,6 mg p-Nitrophenylphosphat pro ml Substratpuffer, Inkubation der Platten bei Raumtemperatur bis eine maximale Farbentwicklung erreicht ist.
- ⑤ Colorimetrische Auswertung der Farbentwicklung am ELISA-Reader (EAR 340 SLT, Crailsheim) bei 405 nm.

2.8.2 Immunfluoreszenzmarkierung (IMF)

Mittels IMF können Hyphen im Epifluoreszenzmikroskop spezifisch angefärbt und damit sichtbar gemacht werden. Bei histologischen Untersuchungen kann so eine Besiedlung des Pflanzengewebes durch *C. globosum* spezifisch aufgezeigt werden. Der Nachweis des Pilzantigens erfolgte bei der IMF wie beim PTA-ELISA nach Bindung des primären Mausantikörpers indirekt mittels RAM-IgG, an das als Reportermolekül das Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert wurde (RAM-IgG-FITC, Dianova). FITC emittiert nach Anregung bei 495 nm gelbgrünes Licht der Wellenlänge 525 nm. Im Fluoreszenzmikroskop können dadurch antikörpermarkierte Pilzstrukturen spezifisch sichtbar gemacht werden. Die Überprüfung der Spezifität erfolgte anhand von Pilzen verschiedener Gattungen, die auf MEA 10 Tage vorgezogen und Lufthyphen durch Aufpressen eines durchsichtigen Tesafilmstreifens abgenommen wurden. Die so fixierten Hyphen konnten dann mit den primären und sekundären Antikörpern inkubiert werden. Danach wurden die Tesastreifen mit der Klebeseite nach unten auf einen Tropfen 0,1 M phosphatgepuffertes Glycerin plus 1,4-Diazobicyclo-(2.2.2)-Octan (DABCO; Merck; 2,5 % in phosphatgepuffertem Glycerin, w/v. Phosphatgepuffertes Glycerin: 0,1 M Na₂HPO₄, 0,1 M NaH₂PO₄, 44 % Glycerin, v/v; pH 7,6) auf einen Objektträger gelegt. DABCO reduziert die Löschung der Fluoreszenz durch Abfangen freier Radikale, die bei der Anregung des FITC durch das Blaulicht entstehen (HARLOW & LANE 1988) und verlängert dadurch die Effektivität der FITC-Markierung.

Zwei Negativkontrollen dienten der Erfassung unspezifischer Bindungen zwischen dem Antigen und dem RAM-IgG: 1) in der Kontrolle mit sekundären Antikörpern wurde der Inkubationsschritt mit den primären Antikörpern ausgelassen; 2) in der Kontrolle mit präimmunem Serum wurde statt des monoklonalen Antikörpers präimmunes polyklonales Kaninchen IgG (1:1000 verdünnt) verwendet.

Einzelschritte der IMF:

- ① Andrücken des Tesastreifens an das Luftmyzel und sofortige Überführung in Reaktionsgefäße mit 1 ml des unverdünnten MAK-Kulturüberstands, dem zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen 2 % Magermilchpulver zugegeben

- wurde. Inkubation der Tesastreifen für 45 min bei Raumtemperatur, danach 3 x waschen mit 1 ml PBST
- ② Zugabe von 500 µl RAM-IgG-FITC, 1:200 verdünnt in Leitungswasser. Inkubation der Tesastreifen für 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (FITC ist lichtempfindlich), danach 3 x waschen mit PBST
 - ③ Überführung auf einen Objektträger in einen Tropfen 0.1 M phosphatgepuffertes Glycerin plus DABCO. Die inzwischen milchig gewordenen Streifen werden nach kurzer Einwirkzeit im phosphatgepufferten Glycerin wieder durchsichtig und damit mikroskopierbar. Aufbewahrung der Objektträger bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung im Dunkeln bei 4 °C.

2.8.3 Bestimmung der pilzlichen Biomasse mittels PTA-ELISA

Der oben beschriebene PTA-ELISA eignet sich außer für die qualitative Detektion von Pilzantigenen auch für die Bestimmung der pilzlichen Biomasse. Dafür wurden die Karyopsen bzw. die axenischen Keimlinge mit *C. globosum* inokuliert und in unbehandelter und sterilisierter Felderde bzw. im MS-Medium kultiviert. Die Pflanzen wurden 14 Tage nach der Inokulation ihren Topfgefäßen bzw. ihren Teströhrchen entnommen und die Erde bzw. das anhaftende MS-Medium vorsichtig unter fließendem Wasser entfernt. Der Umfang der Besiedlung mit *C. globosum* wurde anhand einer Einteilung des Pflanzengewebes in funktionelle Abschnitte im PTA-ELISA näher charakterisiert. Dazu wurden die Pflanzen in folgende 4 Abschnitte geteilt: 1) Wurzelsystem, 2) Scutellum plus Adventivwurzeln und Sproßabschnitt in direkter Umgebung (5 mm) zum Scutellum, 3) Coleoptilenbereich und 4) Blattbereich. Die Quantifizierung des an/in der Pflanze gebildeten Myzels erfolgte über eine Eichkurve, die anhand von lyophilisiertem, gemörsertem und in PBST gelöstem Myzel erstellt wurde (KARPOVICH-TATE et al. 1998). Die Lyophilisierung des Myzels erfolgte nach trockenem Abschaben des Luftmyzels von der Agarplatte mittels eines Gummispatels in einer Gefriertrocknungsanlage (Leybold-Heraeus Lyovac GT-2, Hanau) über einen Zeitraum von 3 h.

Im PTA-ELISA wurden drei Negativkontrollen eingesetzt. 1) die PBS- Kontrolle (s. 2.8.1); 2) axenische Pflanzen aus der MS-Kultur dienten einem Nachweis möglicher unspezifischer Bindungen der MAK an Inhaltsstoffe des Pflanzenpresssaftes. Anhand dieser Negativkontrolle wurde der Schwellenwert für einen positiven Nachweis errechnet. Er wurde aus den Extinktionen der Negativkontrollen plus der dreifachen Standardabweichung dieser Werte errechnet und lag bei einem Extinktionswert von 0,2; 3) Pflanzen aus der Anzucht in Felderde ohne *C. globosum* Inokulum dienten dem Nachweis einer möglichen Infektion mit Pilzen der Gattung *Chaetomium* oder gattungsfremden Pilzen, die mit den MAK kreuzreagieren könnten. Die Positivkontrolle bestand aus axenischen Pflanzen der MS-Kultur, denen eine definierte

Menge Pilzlyophilisat zugegeben wurde. Anhand dieser Kontrolle wurde der Einfluß der Pflanzeninhaltsstoffe auf den Nachweis der pilzlichen Biomasse im PTA-ELISA mit erfaßt.

Einzelschritte im ELISA-Test:

- ① Erstellung eines Pressafthomogenats aus 3 Pflanzen. Die Pflanzen wurden in die oben beschriebenen 4 Pflanzenabschnitte geteilt. Den Wurzeln und den Blättern wurde im Verhältnis 1:2 (w/v), dem Scutellum im Verhältnis 1:5 (w/v) und dem Coleoptilenbereich im Verhältnis 1:3 (w/v) Probenpuffer (PBST plus 2 % Polyvinylpyrrolidon; PVP, Fluka; $M_r=40000$; w/v) zugegeben. Positivkontrolle: Zugabe des in PBS gelösten lyophilisierten Myzels in verschiedenen Verdünnungsstufen zum Pressafthomogenat der axenischen Pflanzen
- ② Zugabe von 100 µl Pressaft, Inkubation der Platten über Nacht bei 4 °C, danach 3x spülen in PBST
- ③ Zugabe von 200 µl MAK-Kulturüberstand, 1:10 verdünnt in Blockierungspuffer, Inkubation der Platten über Nacht bei 4 °C, danach 3 x spülen mit PBST
- ④ Zugabe von 100 µl sekundärer Kaninchen-Antikörperkonjugate, 1:1000 verdünnt in Blockierungspuffer, Inkubation der Platten über Nacht bei 4 °C, danach 3 x spülen mit PBST
- ⑤ Zugabe 200 µl p-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer. Konzentration: 0,6 mg p-Nitrophenylphosphat pro ml Substratpuffer, Inkubation der Platten bei Raumtemperatur bis eine maximale Farbentwicklung erreicht ist.
- ⑥ Colorimetrische Auswertung der Farbentwicklung am ELISA-Reader (EAR 340 SLT, Crailsheim) bei 405 nm.

2.8.4 Tissue Print Immunoblot (TPI)

Das Verfahren dient der Lokalisation von Antigenen an bzw. in der Pflanze. Durch das Pressen quergeschittener Pflanzenteile auf eine Nitrocellulosemembran (Optitran BA-S 85, reinforced NC, Schleicher & Schuell, Dassel) werden Proteine und Nukleinsäuren an die Membran gebunden. Gleichzeitig werden Gewebestrukturen festgehalten, da die Zellwände aufgrund ihrer Druckfestigkeit Vertiefungen in der Membran hinterlassen, die bei der mikroskopischen Auswertung als helle Linien sichtbar werden. Der Nachweis der Antigene erfolgt wie im PTA-ELISA, wobei hier jedoch die alkalische Phosphatase den Phosphatrest des BCIP abspaltet, dieses dann bei alkalischem Milieu dimerisiert und NBT zu einem unlöslichen, blauvioletten Diformazan reduziert (BLAKE et al. 1984, HORWITZ et al. 1966).

Als Negativkontrolle dienten wiederum einerseits PBS und andererseits Pflanzen aus der Kontrollvariante ohne *C. globosum* Inokulum. Als Positivkontrolle wurde der pilzliche Zellwandextrakt direkt auf die Membran pipettiert.

Einzelschritte in TPI:

- ❶ Pressen von quergeschnittenem Pflanzengewebe auf die Membran. Der austretende Pflanzensaft wird vorher durch Tupfen auf ein Stück Zellstoff entfernt, damit der Abdruck nicht durch zuviel Flüssigkeit verläuft
- ❷ Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierungspuffer über Nacht bei Raumtemperatur, danach 3 x 10 min waschen der Membranen mit PBST
- ❸ Inkubation der Membranen in MAK-Kulturüberstand, 1:10 verdünnt in Blockierungspuffer (PBST plus 2 % Magermilchpulver, w/v, plus 2 % PVP, w/v) für 2 h, danach 3 x 10 min waschen der Membranen in PBST
- ❹ Inkubation der Membranen in sekundären Kaninchen-Antikörperkonjugaten, 1:1000 verdünnt in Blockierungspuffer, danach 3 x 10 min waschen in PBST. Die Antikörperlösung wurde aufgefangen und 5-6x wiederverwendet
- ❺ Bei Verwendung von 20 ml Substratpuffer (0,1 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂; pH 9,5) 90 µl NBT¹ und 70 µl BCIP² zugeben und die Entwicklung des blauen Farbstoff-Präzipitats verfolgen. Nach ca. 3-5 min Inkubation die Stopplösung (0,02 M TRIS, 0,5 M EDTA; pH 7,5) zugeben, wenn eine Überfärbung der antigenhaltigen Strukturen eintritt (die vorher sichtbaren scharfen Konturen verlaufen durch eine übermäßige Bildung des Farbstoffpräzipitats).

¹Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma)-Stammlösung: eine Tablette NBT (10 mg) mit 300 µl A. bidest. anlösen und langsam 700 µl Dimethylformamid zugeben. Bei 4 °C aufbewahren.

²5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP, Sigma)-Stammlösung: eine Tablette (25 mg) BCIP in 1 ml Dimethylformamid lösen. Lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren

2.8.5 Immunfluoreszenz (IMF)-Markierung an Hand- und Semidünnschnitten

Immuncytologische Untersuchungen an Handschnitten aus Frischmaterial bieten wesentliche Vorteile gegenüber eingebetteten Proben. Da keine Fixierung durchgeführt wird bleiben antigene Strukturen vollständig erhalten. Dadurch wird eine erfolgreiche Immunmarkierung wesentlich erleichtert. Die Proben können aufgrund der wenigen Aufarbeitungsschritte schnell verarbeitet und mikroskopiert werden. Sie zeichnen sich außerdem durch eine verhältnismäßig hohe Schichtdicke auf, wodurch die Lokalisation des Pilzes im Pflanzengewebe durch die leichte Autofluoreszenz der Zellwände verbessert wird. Ein wichtiger Nachteil besonders bei der Mikroskopie mit konventioneller Auflichtfluoreszenz liegt aber in der Dicke der Schnitte, da es bei immunfluoreszenzmarkierten Präparaten so zur Überstrahlung der Objekte kommt.

Die serologische Aufarbeitung der Handschnitte erfolgte analog zu der schon unter 2.8.2 beschriebenen Methode. Es wurden jeweils mindestens 20 Schnitte aus Wurzelsystemen dreier repräsentativer Pflanzen angefertigt. Die Schnitte wurden in phosphatgepuffertes Glycerin plus DABCO eingedeckelt und mit Nagellack umrandet.

Die IMF-Markierung erfolgte außerdem auch an Wurzelproben, die in LR-White eingebettet wurden. Dadurch konnte die IMF an Handschnitten mit der IMF an Semidünnschnitten verglichen werden. Die Präparate wurden semidünn (1µm) geschnitten und auf der Wärmebank bei 70-80 °C angetrocknet. Eine zweistündige Inkubation der Schnitte mit primären Antikörpern erfolgte bei Raumtemperatur, die sekundären Antikörper wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Allen Inkubationen folgte ein dreimaliges Waschen der Schnitte mit Leitungswasser.

2.9 Präparationstechniken

2.9.1 Totalpräparate

Die Bewertung der Entwicklung von *E. graminis* auf den Blättern erfolgte mikroskopisch anhand von Totalpräparaten, die nach ZEYEN et al. (1991) erstellt wurden. Dazu wurden zunächst die Blattoberseiten mit *E. graminis* inokuliert, 41 h nach der Inokulation die Blätter geerntet und in Glaspetrischalen auf Filterscheiben gelegt (inokulierte Blattseite nach oben), die mit einer Mischung von Ethanol : Eisessig (3:1, v/v) getränkt waren. Danach wurde für die Dauer von 3 Wochen fixiert und entfärbt. Dann wurden die Blätter auf wassergetränktes Filterpapier übertragen, um sie zu strecken und um die Fixierlösung zu entfernen. Der letzte Entfärbeschritt erfolgte auf Lactophenol getränktem Filterpapier, bis die Blätter vollkommen entfärbt waren (2-3 Wochen). In beiden 2-3-wöchigen Entfärbungsschritten wurde die verdunstete Lösung jede Woche ergänzt und die Filterscheiben ausgewechselt. Zum Schluß erfolgte die Übertragung der Blätter auf 80 %iges Glycerin für die Langzeitkonservierung. Für die Bewertung der Pathogenentwicklung wurden die Blätter auf Objektträger gelegt und mikroskopiert.

Der Nachweis einer saprophytischen Besiedlung der Gerste mit *C. globosum* erfolgte mikroskopisch anhand von Totalpräparaten. Die Pflanzen aus unsteriler Felderde (s. 2.3) wurden wie unter 2.6.2 beschrieben mit der Tauchbehandlung N-3,5 einer unzureichenden Oberflächensterilisation unterzogen. Dann wurden die Blattsegmente auf 10 %igem PDA ausgelegt. Nach 5-tägiger Inkubation erfolgte die Entfärbung und Fixierung der Blattsegmente mittels Alkohol:Formaldehyd:Eisessig (18:1:1; v/v) für 24 h. Dann wurden die Blätter mit Anilinblau gefärbt und mikroskopiert.

2.9.2 Hand- und Semidünnschnitte

Für die IMF-Markierung wie auch für die Vitalitätsfärbung der Wurzeln mit DiOC₇(3) wurden Handschnitte (GERLACH 1984) angefertigt. Außerdem wurde die IMF-Markierung auch an Semidünnschnitten durchgeführt. Für die Handschnitte wurden Wurzelstücke und Scutellen mitsamt der umliegenden Gewebe in Styroporstücke (Transportfüllmaterial mit sehr feinen Poren) eingeklemmt, mit Rasierklingen transversal geschnitten und mit Hilfe einer Federstahlpinzette sofort in die Inkubationslösungen überführt. Für die Semidünnschnitte wurden die Wurzelstücke zunächst in das Kunstharz LR White (Plano) eingebettet. Dazu wurden die Wurzeln in 4 mm lange Stücke geschnitten und nach KARNOVSKY (1965) mit 4 % Formaldehyd (v/v), 4 % Glutaraldehyd (v/v) und 0,001 % Calciumchlorid (w/v) in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,3) für 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Nach 4-5 x waschen im gleichen Puffer (Aldehydgeruch muß verschwinden) erfolgte die Dehydrierung mittels einer ansteigenden Ethanol/A. bidest - Reihe:

- 1) 20 min in 15 % Ethanol
- 2) 20 min in 30 % Ethanol
- 3) je 20 min in 50 % Ethanol und 1 x die Lösung erneuern
- 4) je 20 min in 70 % Ethanol und 1 x die Lösung erneuern
- 5) je 20 min in 90 % Ethanol und 1x die Lösung erneuern
- 6) schließlich je 60 min in 96 % Ethanol und 2 x die Lösung erneuern.

Die anschließende Einbettung in LR White erfolgte wieder in einer aufsteigenden Reihe aus LR White : Ethanol: 1) 16 h in 1:3 (v/v); 2) 8 h in 1:1 (v/v); 3) 16 h in 3:1 und schließlich 3-5 Tage in 100% LR White. Die Polymerisation erfolgte in geschlossenen Gelatinekapseln (Größe 4) bei 50 °C für 48 h. Die Proben wurden an einem Mikrotom (Leica, Bensheim, vormals Reichert-Jung) in einer Dicke von 1 µm mit einem Glasmesser geschnitten, auf Objektträger transferiert und auf einer Wärmebank bei 70-80 °C angetrocknet.

2.10 Färbungen für die Hellfeldmikroskopie

Durch eine Anilinblaufärbung wurde zum einen handgeschnittenes Wurzel- und Scutellumgewebe aus der MS-Anzucht auf eine Besiedlung mit *C. globosum* untersucht, zum anderen mittels Totalpräparaten von Blättern die saprophytische Besiedlung der ausgelegten Blattsegmente aufgezeigt. Die Proben wurden:

- 1) 0,5-1 min in einer Anilinblau-Milchsäure-Lösung (0,1 % Anilinblau, Merck, w/v, in 2:1 70 %iges Ethanol:85 %ige Milchsäure) gefärbt und

2) weitere 5-10 min in einer Lactophenollösung (10 % Phenol, w/v, in 10:2:1 Milchsäure: 95 %iges Ethanol:Glycerin) entfärbt.

Die Hyphen sowie das Cytoplasma, insbesondere die Zellkerne werden intensiv blau gefärbt, das Wirtsgewebe wird dagegen nur schwach gefärbt.

Die Färbung in LR White eingebetteter Wurzeln und Blätter mit Toluidinblau O (Merck, 1 % in 1 %iger $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -Lösung, w/v) diente der Anfärbung und damit Sichtbarmachung des Pflanzengewebes und der Hyphen. Die dem Objektträger anhaftenden Schnitte wurden mit einem Tropfen der Toluidinblaulösung bedeckt. Dann wurden die Schnitte auf der Wärmebank für eine Minute inkubiert und mit A. demin. gewaschen. Das Cytoplasma, RNA-haltige Strukturen und unverholzte Zellwände färben sich violett; phenolhaltige Pflanzenteile färben sich durch die Metachromasie des Farbstoffs blaugrün bis grün (GERLACH 1984, GAHAN 1984).

2.11 Vitalitätsfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung vitaler Membransysteme oberflächensterilisierter Wurzelgewebe mitsamt ihrer inter- bzw. intrazellulärer Hyphen von *C. globosum* wurde nach DUCKETT & READ (1991) eine wäßrige 3,3-Diheptyloxacarbocyanin-jodid ($\text{DiOC}_7(3)$, Molecular Probes, 0,1 μM)-Lösung verwendet. Die $\text{DiOC}_7(3)$ -Lösung wurde immer frisch aus der 1 mM, ethanolischen Stammlösung angesetzt. Wurzeln aus axenischer Pflanzenanzucht mit *C. globosum* Inokulum wurden mit der Tauchbehandlung P-10 oberflächensterilisiert und transversal mit der Hand geschnitten. Die Schnitte wurden dann in der $\text{DiOC}_7(3)$ -Lösung für ca. 2 h im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Schnitte in Glycerin eingedeckelt. Fluoreszenzmikroskopisch konnte mit dieser Technik nachgewiesen werden, wie tief die Sterilisationsreagenzien in das Gewebe eingedrungen waren.

Die Färbung mit $\text{DiOC}_7(3)$ diente außerdem dem Nachweis physiologischer Veränderungen in der Epidermis der Wurzelzellen nach epiphytischer Besiedlung der Gerstenwurzeln mit *C. globosum*. Besiedelte Wurzeln aus steriler Erde wurden transversal geschnitten und wie oben beschrieben gefärbt. Die Intensität der Fluoreszenzfärbung, die nur an vitalen Zellkompartimenten aufgrund von Membranpotentialen auftritt (JOHNSON et al. 1981), wurde als Maß für die Aktivität der Epidermiszellen gewertet.

2.12 Mikroskopie

Sowohl die IMF-markierten Hand- und Semidünnschnitte als auch die Vitalitätsfärbungen der Handschnitte mit $\text{DiOC}_7(3)$ wurden mit Hilfe der Auflichtfluoreszenzoptik am DMRB

Photomikroskop (Leica, Bensheim) unter Verwendung eines FITC-Filters (Leica FI/RH Filtersystem mit einem Anregungsfilter mit maximalem Durchlaß bei 490 und 560 nm, einem Teilerspiegel mit Durchlaß über 500nm und einem Sperrfilter mit maximalem Durchlaß bei 525 und 605nm) ausgewertet. Die Hellfeldmikroskopie der Totalpräparate und der Hand- bzw. Dünnschnitte erfolgte am DMRB Photomikroskop bei Normarski differentiellem Interferenzkontrast.

Die Dokumentation erfolgte auf Fujichrome Tageslichtdiafilmen: 400 ASA bei Fluoreszenzmikroskopie, 100 ASA bei Hellfeld-Mikroskopie.

2.13 Datenverarbeitung

Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des Programms Statgraphics Plus® (Manugistics, Rockville, USA) anhand des t-Tests nach STUDENT ermittelt (Frisch- oder Trockengewichte, Anzahl der Mehлтаupusteln pro cm Blattfläche, Anzahl der Mehлтаukonidien pro cm² Blattfläche der Kontrollen bzw. der mit *C. globosum* behandelten Varianten). Für die statistische Analyse prozentualer Werte (*E. graminis* Konidienkeimung, Konidien mit Appressorien, Appressorien mit Haustorien, lokale Autofluoreszenz der Epidermiszellen) wurde die Notwendigkeit der Transformation mittels Arcus-Sinus geprüft. Signifikante Unterschiede wurden dabei für P Werte $\leq 0,05$ angenommen und in den Graphiken mit einem Stern (*) versehen. Hochsignifikante Unterschiede wurden für P Werte $\leq 0,001$ angenommen und in den Graphiken mit einem Doppelstern (**) versehen.

3 Ergebnisse

3.1 Oberflächensterilisation

Mittels Oberflächensterilisation sollte eine mögliche endophytische Besiedlung des Gewebes der Gerstenpflanze mit *C. globosum* anhand einer Standardmethode mit den Sterilisationsmitteln Ethanol (95%) und NaOCl (3,5% aktives Chlor) bei folgenden Einwirkzeiten aufgezeigt werden: 0,5 min Ethanol gefolgt von 5 min NaOCl und erneut 0,5 min Ethanol (FISHER et al. 1991, SCHULZ et al. 1995, CROUS et al. 1995). Diese Tauchbehandlung wird im Folgenden als N-3,5 bezeichnet.

In diesen Voruntersuchungen zur endophytischen Besiedlung der Gerste wurden die zwei Wochen alten Pflanzen ihren Topfgefäßen entnommen und die den Wurzeln anhaftende Erde unter fließendem Wasser entfernt. Nach der Standard-Oberflächensterilisation mit N-3,5 wurden die Gewebesegmente auf 10 % PDA ausgelegt und die endophytische Besiedlung der Segmente bonitiert. Bis zu 90 % der Wurzel- bzw. Blattsegmente zeigten eine solche Besiedlung. In histologischen Untersuchungen zeigte sich jedoch nur in dem auf PDA inkubierten Gewebe Hyphen. Diese Hyphen konnten grundsätzlich Ascosporen zugeordnet werden, die sich auf der Pflanzenoberfläche befanden. Die Gewebeteile, die nicht auf PDA ausgelegt gewesen waren, zeigten in keinen der durchgeführten Untersuchungen Hyphen. Die Ascosporen hatten demnach die Oberflächensterilisation überlebt und entstammten offensichtlich der Koleoptilen-Inokulation vor der Pflanzenanzucht. Folglich erwies sich die anhand der Standard-Oberflächensterilisation gefundene "endophytische" Besiedlung als saprophytische Besiedlung (Abb. 4-8). Daher wurde die Effektivität verschiedener Sterilisationsmittel anhand von Vitalitätstests überprüft, um eine wirksame Oberflächensterilisation zu finden. Die Oberflächensterilisationsmethode, die sich dann als effektiv erwiesen hatte, wurde zur Bewertung der endophytischen Besiedlung herangezogen.

3.1.1 Vitalitätstests mit *Chaetomium globosum* und *C. funicola* Ascosporen

3.1.1.1 Ascosporenvitalitätstest auf Nitrocellulosemembranen

Die Vitalität von *C. globosum* und *C. funicola* Ascosporen, die auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht worden waren, konnte durch eine 3-Schritt Tauchbehandlung mit den Sterilisationsmitteln stark herabgesetzt werden (Tab. 2). Bei einem Einsatz von NaOCl-Konzentrationen $\geq 3,5$ % (aktives Chlor) in der Tauchbehandlung N-3,5 bzw. N-9 war eine ausreichende Abtötung der Sporen (die Sporenkeimung war $< 1\%$) festzustellen. Eine ausreichende Abtötung der Sporen wurde außerdem durch die

Tauchbehandlung P-10 bzw. durch eine Tauchbehandlung mit 2 % NaOCl bei verlängerter Einwirkung des Ethanol (5 min Ethanol, 95 %, 5 min NaOCl, 0,5 min Ethanol, 95 %) erreicht. Eine vollständige Reduktion der Ascosporenkeimung auf 0 % konnte mit keiner der untersuchten Kombinationen erreicht werden.

Abb. 4-8. Saprophytische Besiedlung der Gerste mit *Chaetomium globosum*. Gerstensaatzgut wurde mit einer *C. globosum* Ascosporensuspension behandelt. Nach einer zweiwöchigen Anzuchtphase wurden die Pflanzen einer NaOCl-Tauchbehandlung (N-3,5) unterzogen. Die an der Oberfläche des Gewebes anhaftenden Sporen werden dabei nur unvollständig abgetötet. Bei 3-5 tägiger Inkubation der Pflanzensegmente auf PDA besiedeln die noch vitalen Sporen das Gewebe saprophytisch, täuschen jedoch eine endophytische Besiedlung vor.

Abb. 4 und 5. Besiedlung eines Wurzelsegments mit *C. globosum* auf PDA: die Hyphen von *C. globosum* besiedeln das Gewebe saprophytisch inter- und intrazellulär und wachsen an der Schnittstelle des Segments wieder aus (Abb. 4: 3 Tage auf PDA nach der Tauchbehandlung, 40-fache Vergrößerung; Abb. 5: 5 Tage auf PDA nach der Tauchbehandlung, 10-fache Vergrößerung).

Abb. 6 und 7. Besiedlung eines Blattscheidensegments mit *C. globosum* (Pfeil): auch hier besiedeln die Hyphen von *C. globosum* das Gewebe saprophytisch und wachsen an der Schnittstelle des Segments wieder aus (Abb. 6: 3 Tage auf PDA nach der Tauchbehandlung, 40-fache Vergrößerung; Abb. 7: 5 Tage auf PDA nach der Tauchbehandlung, 10-fache Vergrößerung).

Abb. 8. Saprophytisches interzelluläres Wachstum von *C. globosum* (Cg) im Mesophyllgewebe (Me) eines Blattsegments (Hellfeldaufnahme, Anilinblaufärbung).

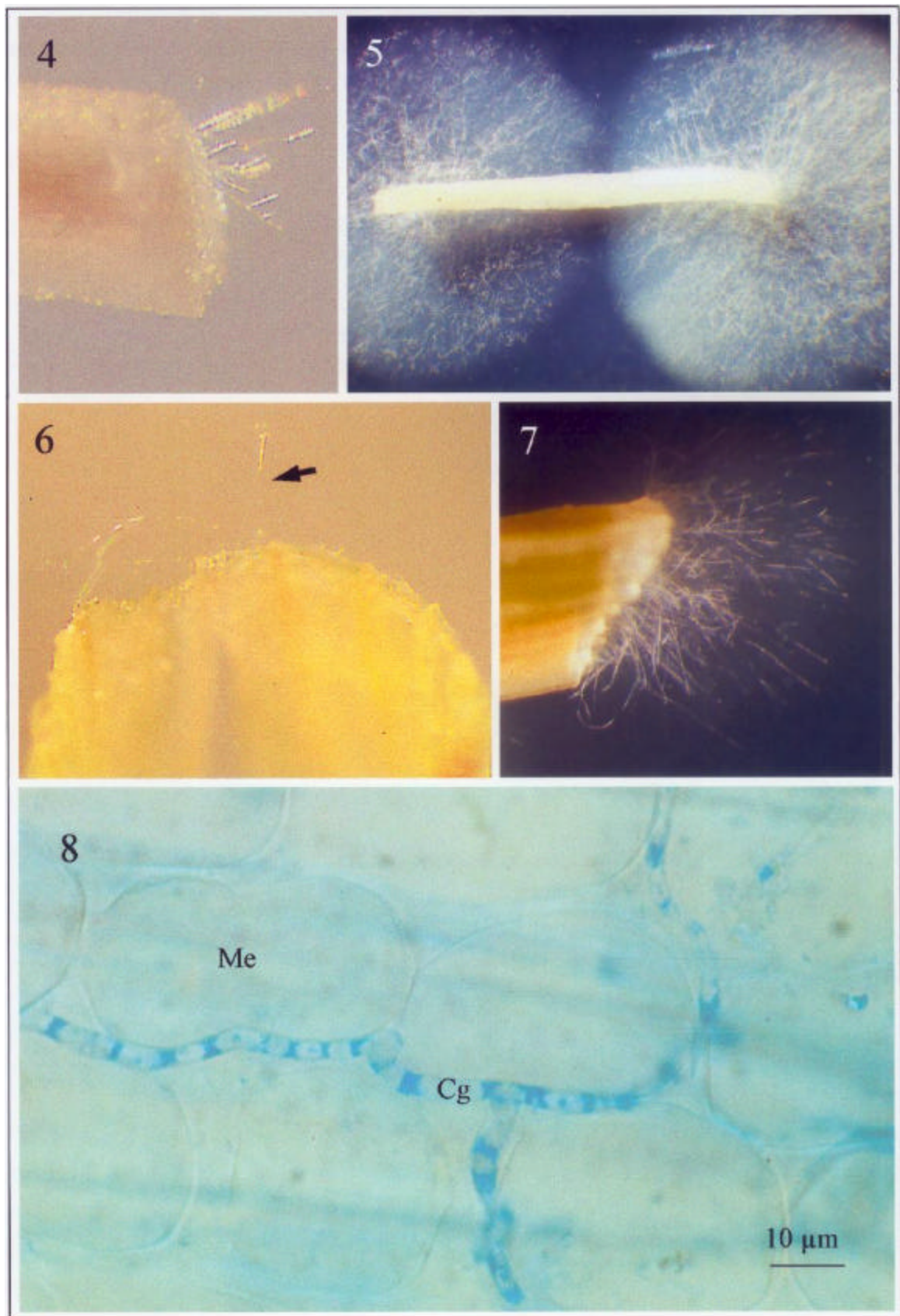


Tabelle 2. Einfluß von Tauchbehandlungen mit unterschiedlichen Sterilisationsmitteln und unterschiedlichen Einwirkzeiten auf die Keimung von *Chaetomium* spp. Ascosporen. Die auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragenen Ascosporen wurden mit Kombinationen aus oxidierend wirkendem Reagenz und Ethanol (EtOH) behandelt und danach mit sterilem Wasser gespült. Die Kontrolle wurde nur mit sterilem Wasser behandelt.

verwendetes oxidierend wirkendes Reagenz	Einwirkzeiten der Tauchbehandlung [min]			Ascosporenkeimung nach ca. 30 h* [%]	
	EtOH	Reagenz	EtOH	<i>C. globosum</i>	<i>C. funicola</i>
H ₂ O (Kontrolle)	-	-	-	75	45
0,7 % NaOCl	1	5	0,5	8	27
	5	5	0,5	1	2
	5	15	5	1	1
2 % NaOCl	1	5	0,5	1	1
	5	5	0,5	0,2	0,1
	5	15	5	0,2	0,1
3,5 % NaOCl N-3,5	1	5	0,5	0,2	0,1
5 % Peressigsäure P-5	1	5	0,5	1	0,2
9 % NaOCl N-9	1	5	0,5	0,2	0,1
10 % Peressigsäure P-10	1	5	0,5	0,1	0,01

N-3,5, P-5, N-9, P-10 Tauchbehandlungen die im Vitalitätstest mit Ascosporen die axenischer Gerste anhaften erneut getestet wurden

* Die Bestimmung der Ascosporenkeimung erfolgte zu leicht abweichenden Zeiten aufgrund unterschiedlicher Keimungsgeschwindigkeiten, abhängig von der Pilzspecies und der Behandlungsart (s. 2.6.1)

3.1.1.2 Vitalitätstest mit Ascosporen die axenischer Gerste anhaften

Im Vitalitätstest mit Ascosporen, die vor der Behandlung auf das Gewebe von Pflanzen aus axenischer MS-Kultur aufgebracht worden waren, wurden die Ergebnisse der Tauchbehandlungen N-3,5, P-5, N-9 und P-10 des Vitalitätstests auf Nitrocellulosemembranen erneut getestet. Dadurch sollte überprüft werden, ob diese Oberflächensterilisationsmethoden die gleiche Wirksamkeit an lebendem Pflanzengewebe besitzen.

Die Untersuchungen verdeutlichen, daß nur im Falle der Tauchbehandlung P-10 kein Hyphenwachstum, das von keimfähigen Ascosporen auf der Pflanzenoberfläche ausgeht, gefunden werden konnte. Alle untersuchten Gewebesegmente blieben bei dieser

Tauchbehandlung besiedlungsfrei (Abb. 10, Dreiecke). Bei Verwendung der Tauchbehandlung N-3,5 zeigte sich im Vergleich zur Positivkontrolle lediglich eine Reduktion der Anzahl besiedelter Gewebeselemente. Nach 6 tägiger Inkubation waren 27 % der Wurzel- und 71 % der Blattsegmente mit *C. globosum*, 31 % der Wurzel- und 66 % der Blattsegmente mit *C. funicola* besiedelt, wogegen in der ohne Sterilisationsreagenzien behandelten Kontrolle 100 % der untersuchten Gewebeselemente besiedelt waren. Außerdem war eine eintägige Keimungsverzögerung zu beobachten (Abb. 9). Durch den Einsatz der Tauchbehandlung N-9 konnte der prozentuale Anteil der mit *C. globosum* besiedelten Gewebeselemente auf 10 % (Wurzelsegmente) bzw. 20 % (Blattsegmente) erniedrigt werden (Abb. 10, Kreise). Es zeigte sich demnach ein in etwa linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des eingesetzten NaOCl und prozentualem Anteil besiedelter Gewebeselemente (Abb. 10). Durch den Einsatz der Tauchbehandlung P-5 konnte der prozentuale Anteil der mit *C. globosum* besiedelten Gewebeselemente im Vergleich zur Tauchbehandlung N-9 zwar noch weiter reduziert, jedoch nicht vollständig unterdrückt werden (keine Abbildung).

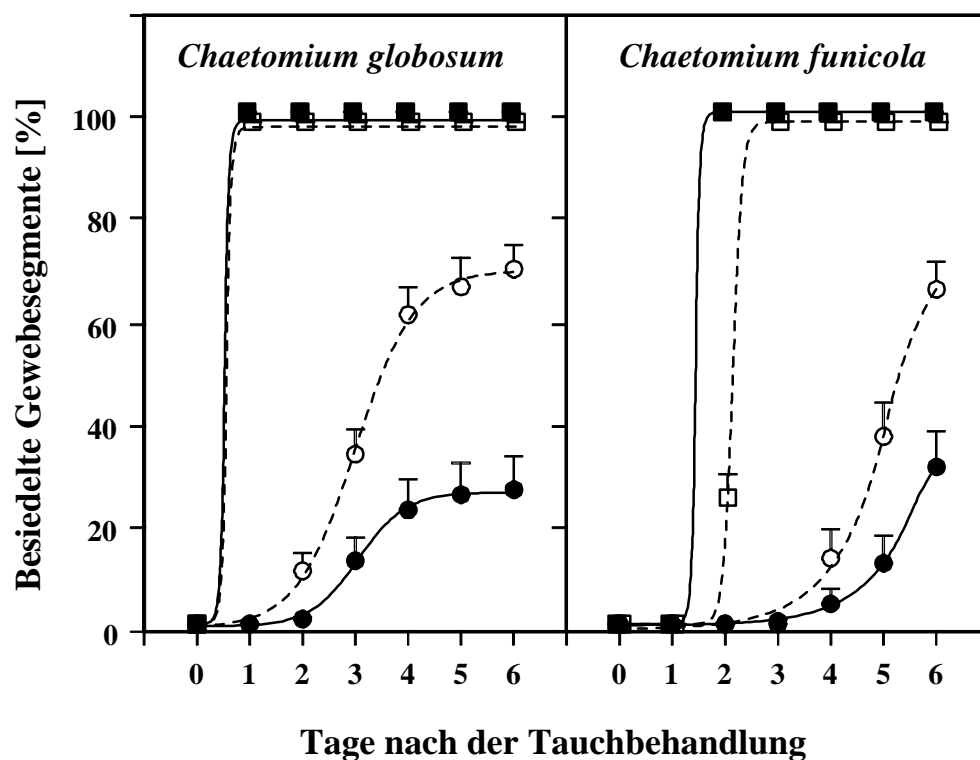


Abb. 9. Wirkung der Tauchbehandlung N-3,5 (1 min 95 % Ethanol, 5 min 3,5 % NaOCl und 0,5 min Ethanol) auf die Anzahl besiedelter Gewebeselemente und damit der *Chaetomium* spp. Ascosporenkeimung nach Applikation der Ascosporen an axenische Wurzeln (●—●) bzw. Blätter (○—○) im Vergleich zu Wurzeln (■—■) bzw. Blätter (□—□) der Positivkontrolle (Mittelwerte + SEM, n=10).

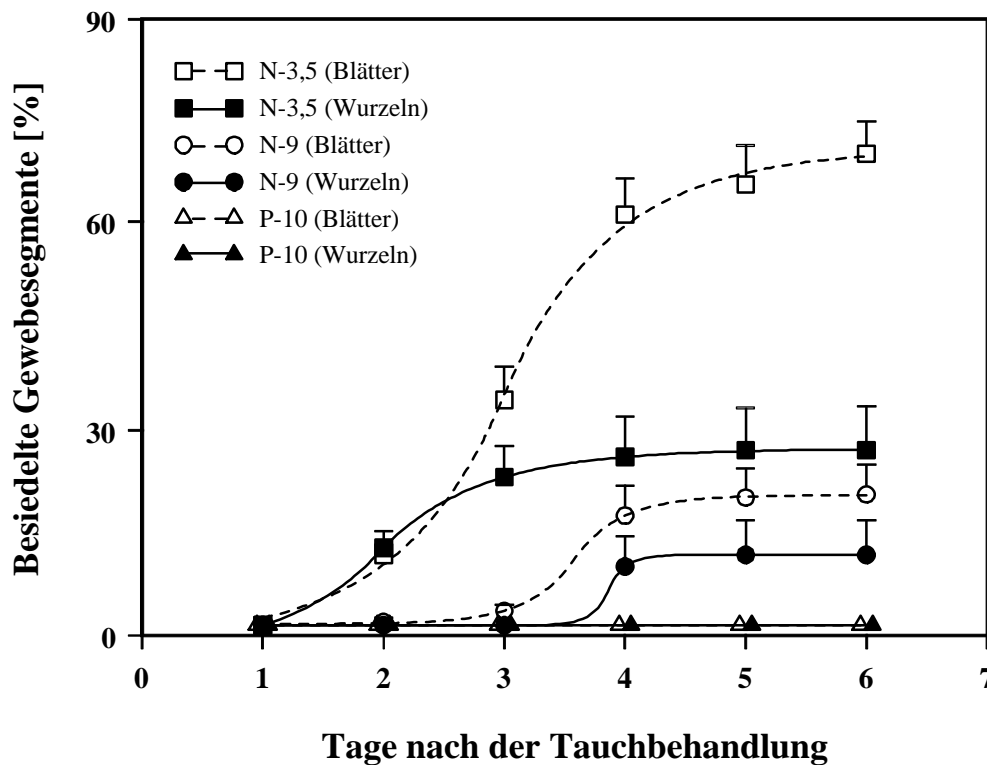


Abb. 10. Wirkung der Tauchbehandlung N-3,5 , N-9 und P-10 auf die Anzahl besiedelter Gewebesegmente und damit der *Chaetomium globosum* Ascosporenkeimung nach Applikation der Ascosporen an axenische Wurzeln und Blätter (Mittelwerte + SEM, n=10).

Eine vollständige Abtötung der vor der Behandlung künstlich auf das Gewebe von axenischen Pflanzen aufgetragenen Ascosporen konnte mit NaOCl demnach nicht erbracht werden. Dieses Reagenz eignete sich somit nicht zum Nachweis einer endophytischen Besiedlung der Gerste mit *C. globosum*. Wird das Pflanzenmaterial dagegen mit Peressigsäure durch die Tauchbehandlung P-10 oberflächensterilisiert, konnte eine vollständige Abtötung der *C. globosum* Ascosporen erreicht werden (Abb. 10, Dreiecke). Daher wurde diese Methode in den folgenden Experimenten für den Nachweis einer endophytischen Besiedlung verwendet.

3.1.2 Nachweis von *Chaetomium globosum* in planta bei Anzucht im MS-Medium

Für den Nachweis von *C. globosum* in planta wurden Wurzeln aus der Pflanzenanzucht im MS-Medium verwendet. Axenische Gerstenkeimlinge wurden hierfür in Teströhrchen gesetzt die mit MS-Medium und *C. globosum* Ascosporen befüllt waren und für 2 Wochen inkubiert.

Schon das äußere Erscheinungsbild der Wurzeln aus diesem Anzuchtssystem deutet auf die enge Wechselbeziehung zwischen *C. globosum* und der Pflanze hin: Die Wurzeln wiesen Verbräunungen insbesondere in den vollständig vom MS-Medium umgebenen Wurzeln auf (Abb. 11). Anhand der Tauchbehandlung P-10 zur Oberflächensterilisation des Wurzelgewebes wurde dann die Besiedlung des Pflanzengewebes mit *C. globosum* untersucht. Nach 6 Tagen Inkubation der oberflächensterilisierten Wurzeln zeigten 20 % der Wurzelstücke eine Besiedlung mit *C. globosum*. Der Pilz wuchs somit entweder intra- oder interzellulär im Wurzelgewebe. Die Blätter waren dagegen besiedlungsfrei.

3.1.3 Nachweis von *Chaetomium globosum* in planta bei Pflanzenanzucht in steriler Erde

Die Tauchbehandlung P-10 sollte außerdem auch die endophytische Besiedlung der Pflanze mit *C. globosum* bei Anzucht der Pflanzen in steriler Erde aufzeigen. Hierfür wurden oberflächensterilisierte Karyopsen in eine *C. globosum* Ascosporensuspension geraucht und in sterile Erde gesät. Nach einer zweiwöchigen Anzuchtphase wurden die Pflanzen entnommen. Alle Pflanzen, sowohl die der Behandlung als auch die der Kontrolle, zeigten im Vergleich zu Anzucht in unsteriler Erde oder in MS-Kultur starke Wachstumsdepressionen. Die behandelten Pflanzen wiesen jedoch im Vergleich zur Anzucht in MS-Kultur keine Verbräunungen des



Abb. 11. Gerstenpflanzen in MS-Kultur. Die mit *Chaetomium globosum* inokulierten Pflanzen (rechts) zeichnen sich im Gegensatz zur axenischen Kontrolle durch Verbräunungen des Wurzelsystems aus.

Wurzelsystems auf, sondern erschienen gesund. Die nach der Oberflächensterilisation mittels der Tauchbehandlung P-10 auf PDA ausgelegten Wurzelsegmente zeigten nach 7 Tagen Inkubation keinerlei Hyphenwachstum und demzufolge keine endophytische Besiedlung mit *C. globosum*.

3.1.4 Nachweis der Eindringung der Sterilisationsreagenzien in das Pflanzengewebe

Der Nachweis der Eindringung der Sterilisationsreagenzien Peressigsäure und Ethanol der Tauchbehandlung P-10 in das Wurzelgewebe erfolgte anhand einer Vitalitätsfärbung mit DiOC₇(3). Im Fluoreszenzmikroskop erscheinen die Membranen vitaler Pflanzenzellen bzw. vitaler Hyphen aufgrund ihres Membranpotentials in einer gelbgrünen Fluoreszenz, während abgetötete Zellen aufgrund ihres fehlenden Membranpotentials nicht fluoreszieren. Die mit *C. globosum* inokulierten Wurzeln der MS-Kultur zeigten eine intensive inter- und intrazelluläre Besiedlung mit dem Pilz (Abb. 13), dessen epiphytische und intrazellulären Hyphen der Epidermis jedoch nach der Tauchbehandlung P-10 nicht mehr fluoreszierten (Abb. 14). Es konnte demnach gezeigt werden, daß die Sterilisationsmittel bis in die Epidermis der Gerstenwurzel eindringen und sowohl das Pflanzengewebe, als auch die dort vorhandenen Hyphen abtöten. Anhand der Vitalitätsfärbung konnte außerdem gezeigt werden, daß die intrazelluläre Besiedlung der Zellen durch *C. globosum* mit einem Vitalitätsverlust dieser Zellen einhergeht: bei allen intrazellulär besiedelten Cortex- und Epidermiszellen war keine Fluoreszenz zu beobachten, während alle unbesiedelten Zellen fluoreszierten. Die mit *C. globosum* besiedelte, aber nicht mit der Tauchbehandlung P-10 behandelte Kontrolle zeigte eine gleichmäßige Fluoreszenz aller Hyphen und Gewebeteile mit Ausnahme der mit *C. globosum* besiedelten Zellen der Epidermis (Abb. 12, Pfeilspitze).

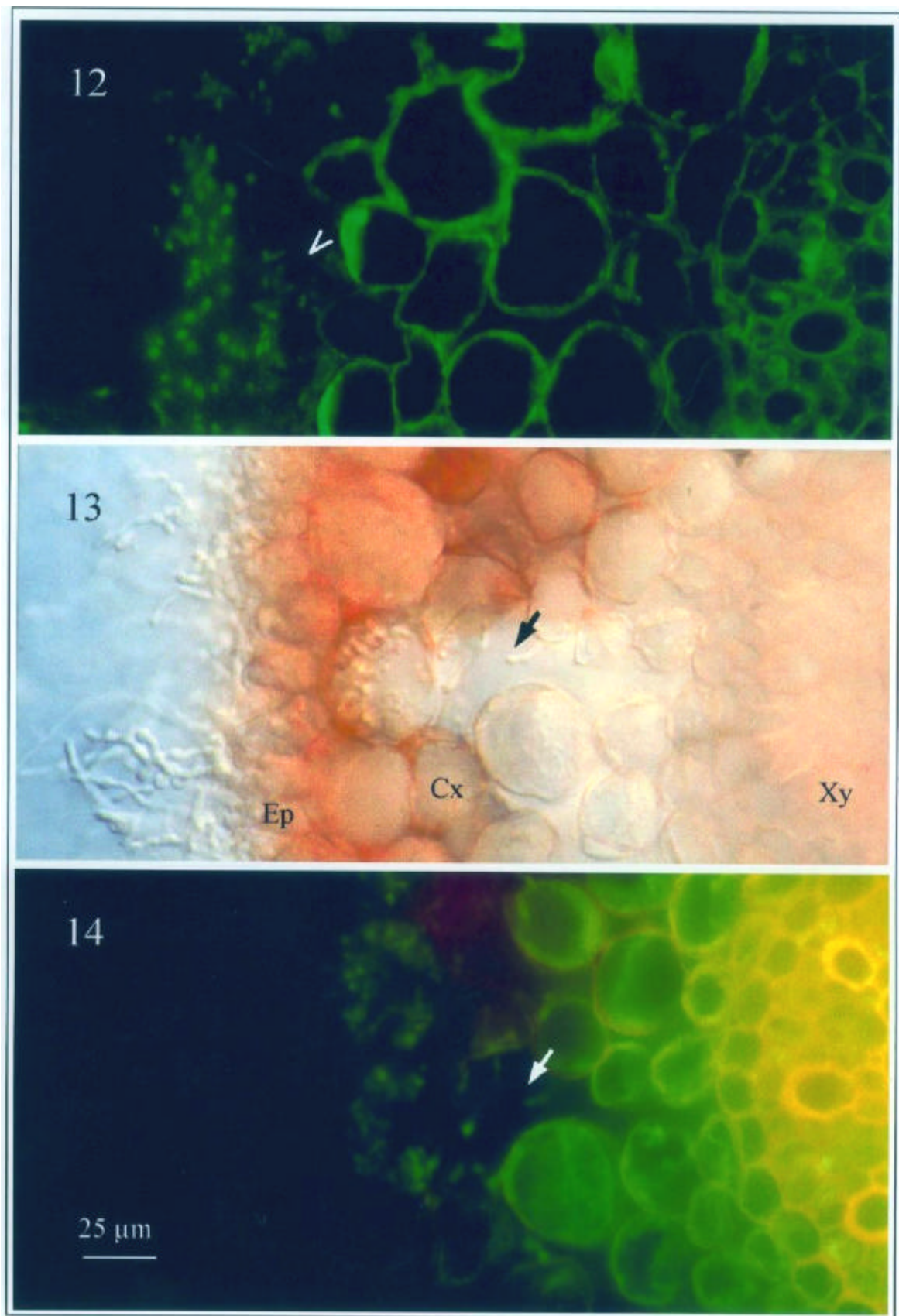
Abb. 12-14. Inter- und intrazelluläre Besiedlung der Gerstenwurzeln mit *Chaetomium globosum*.

Abb. 12. Querschnitt einer Wurzel der Kontrolle ohne Tauchbehandlung mit Peressigsäure. Die Vitalität der Pilz- und Pflanzenzellen ist mit Ausnahme der Epidermis (Pfeilspitze) im gesamten Querschnitt intensiv (Epifluoreszenzaufnahme, Vitalitätsfärbung mit DiOC₇(3)).

Abb. 13. Querschnitt einer Wurzel nach der Tauchbehandlung mit Peressigsäure. *C. globosum* besiedelt das Gewebe intensiv inter- (Pfeil) und intrazellulär (Hellfeldaufnahme, Vitalitätsfärbung mit DiOC₇(3)).

Abb. 14. Gleicher Bildausschnitt der Abb. 11 bei Epifluoreszenz. Ein Vitalitätsverlust der Pilz- und Pflanzenzellen ist im Bereich der von den Sterilisationsmitteln erreichten Epidermis zu erkennen. Inter- (Pfeil) und intrazelluläre Hyphen des Cortexgewebes, unbesiedelte Zellen des Cortex, sowie der Zentralzylinder sind dagegen vital (Vitalitätsfärbung mit DiOC₇(3)).

Ep, epidermis; Cx, Cortex; Xy, Xylem.



3.2 Serologischer Nachweis von *Chaetomium globosum*

3.2.1 Spezifität und Sensitivität der Antikörper

3.2.1.1 Plate Trapped Antigen (PTA)-ELISA

Im PTA-ELISA wurde sowohl die Spezifität der monoklonalen Antikörper (MAK) der drei selektierten Hybridoma-Zelllinien, 1-2C12-F12-G2 (A), 1-2C12-F12-H2 (B) und 1-2C12-A7-E6 (C), als auch die Sensitivität der Zelllinie C überprüft. Die Bestimmung der Spezifität der drei Zelllinien erfolgte an Myzel 13 verschiedener Pilzgattungen (Abb. 15 A-C). Alle Antikörper sind Gattungsspezifisch, d. h. es konnten Kreuzreaktionen mit *Chaetomium* spp. festgestellt werden, aber keine Reaktion mit Pilzen anderer Gattungen. Auffallend ist die fehlende Kreuzreaktion mit *C. irregulare* und die leichte Kreuzreaktion mit *Trichoderma harzianum*, die jedoch mit einer Extinktion von 0,07 innerhalb des Vertrauens der Negativwerte lag. Die MAK der drei getesteten Zelllinien zeigten die gleiche Nachweisspezifität, so daß alle drei Linien für einen Nachweis von *Chaetomium* spp. gleichermaßen genutzt werden konnten.

Abb. 15 A

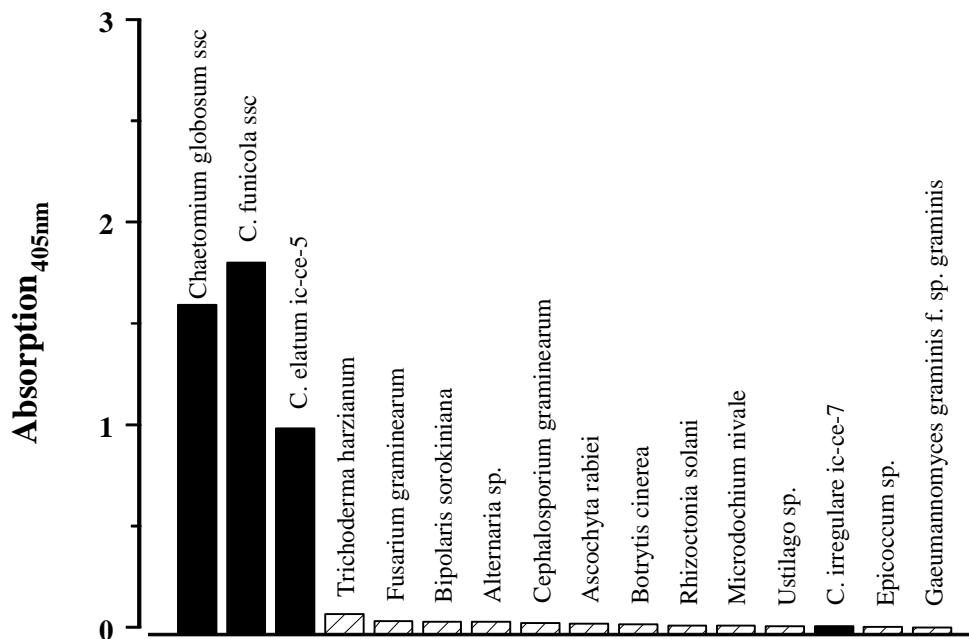


Abb. 15 B

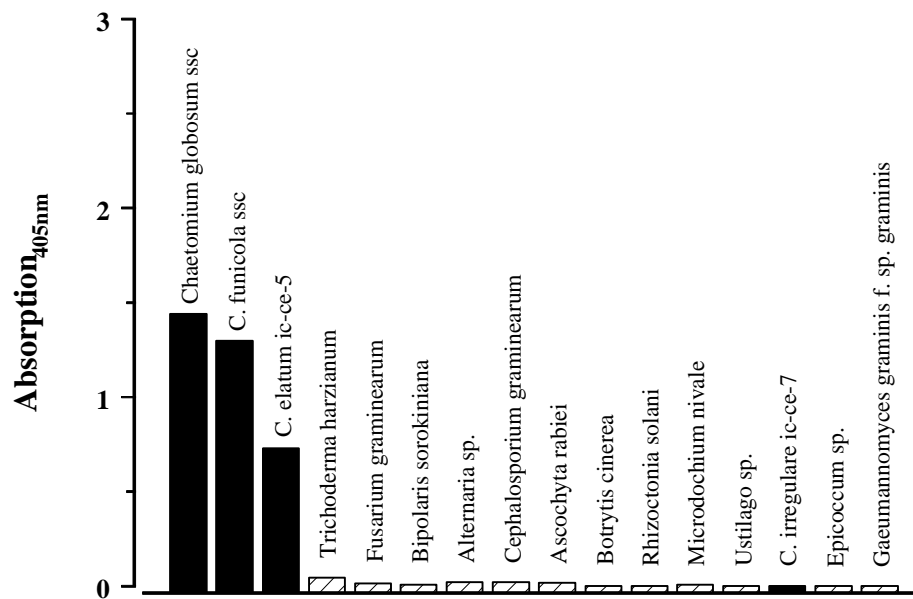


Abb. 15 C

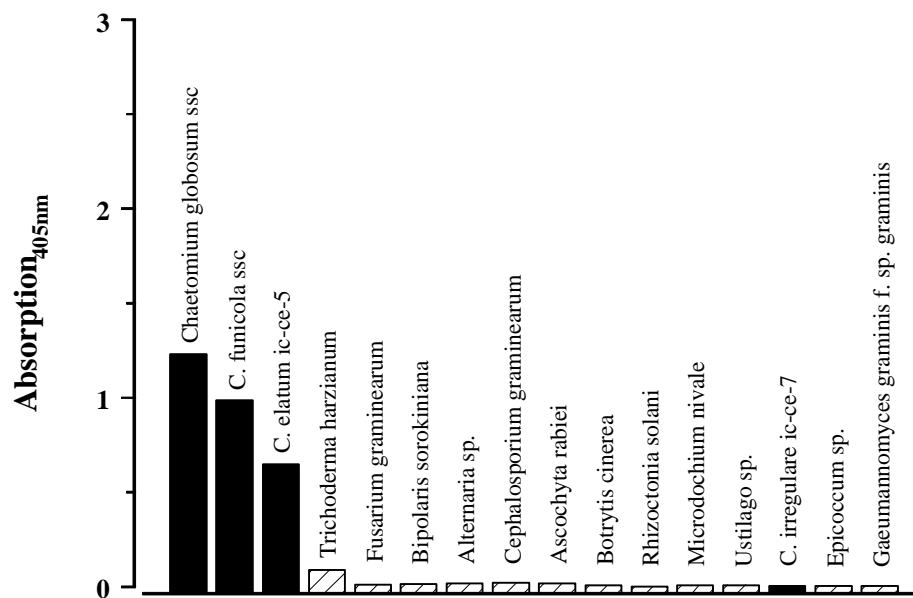


Abb. 15 A-C. Spezifität der Monoklonalen Antikörper der Zelllinien 1-2C12-F12-G2 (A), 1-2C12-F12-H2 (B) und 1-2C12-A7-E6 (C) gegen Pilzantigene verschiedener Pilze im PTA-ELISA.

Die Bestimmung der Sensitivität des MAK der Zelllinie C erfolgte im PTA-ELISA mit dem *C. globosum* Zellwandextrakt, der auch für die Immunisierung der Mäuse verwendet wurde (s. 2.7.1). Die Nachweisgrenze lag bei 3 µg Pilzprotein pro ml (Abb. 16), da eine Positivbewertung des Nachweises bei einer Extinktion ≥ 0.2 zugrunde gelegt werden muß (s. 2.8.3). Da 1 µg Pilzprotein in etwa aus 55 µg Pilzfrischgewicht gewonnen wurde, entspricht diese Nachweisgrenze in etwa 165 µg Pilzfrischgewicht.

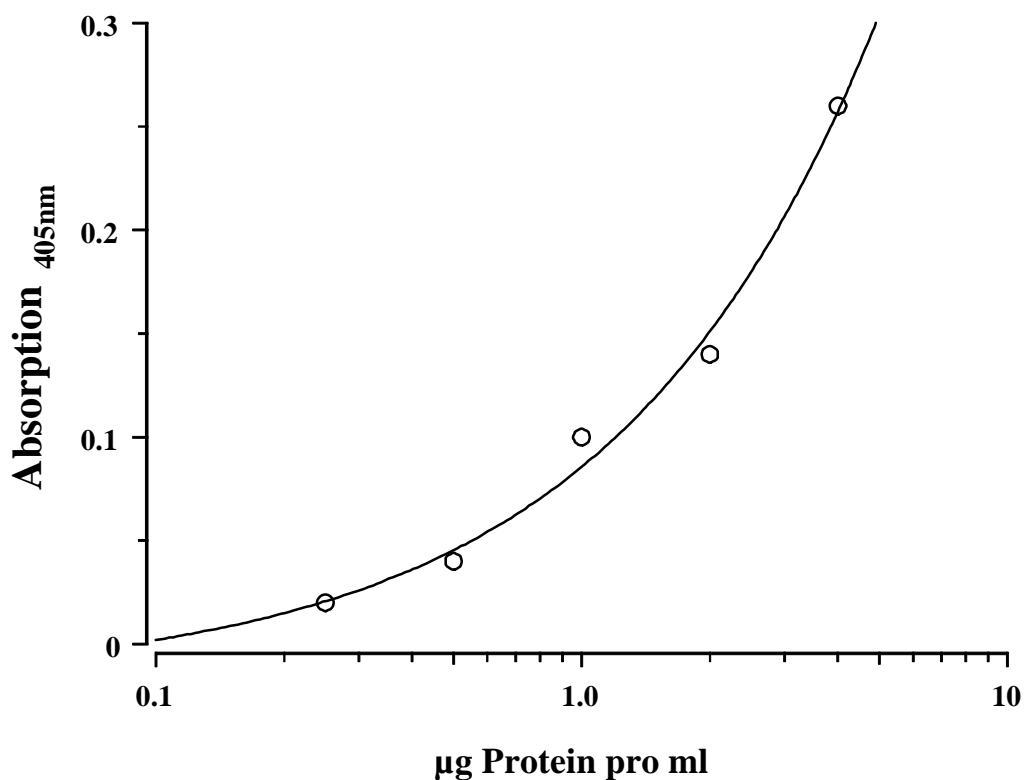


Abb. 16. Sensitivität der monoklonalen Antikörper der Zelllinie 1-2C12-A7-E6 (C) gegen *Chaetomium globosum* Zellwandextrakt im PTA-ELISA

3.2.1.2 Immunfluoreszenz (IMF) - Markierung

Die Antikörperspezifität der Zelllinie C wurde auch mittels der IMF an 15 Pilzarten getestet (Tab. 3). Dazu wurden die Pilze auf MEA vorgezogen, die Hyphen an Klebestreifen fixiert, in die Antikörperlösungen überführt und auf Objektträger übertragen. Die Präparate wurden fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des PTA-

ELISA fluoreszierten Zellwandbestandteile aller *Chaetomium* spp. mit Ausnahme des *C. irregulare* Isolats ic-ce-7. Die Markierung erfolgte spezifisch in der vegetativen und nicht in der generativen Phase in Form einer IMF der Hyphen und einer fehlenden IMF der Perithezien und Ascosporen des Isolates *C. globosum* ssc 3 (Abb. 17-20). Im Gegensatz zu den Ergebnissen des PTA-ELISAs kreuzreagierten die Antikörper jedoch auch mit den Hyphen von *Trichoderma harzianum* (Abb. 21 und 22). Die monoklonalen Antikörper kreuzreagierten im IMF-Test ansonsten mit keiner weiteren Pilzart (Tab. 3, Abb. 23 und 24). In allen weiteren Versuchen wurden die monoklonalen Antikörper der Zelllinie C für die serologischen Nachweisverfahren verwendet.

Abb. 17-24. Immunfluoreszenzmarkierung von *Chaetomium globosum* und *Trichoderma* spp.

Abb. 17. Perithecium von *C. globosum* (Pfeil) umgeben von *C. globosum* Hyphen (Hellfeldaufnahme, Immunfluoreszenzmarkierung mit FITC).

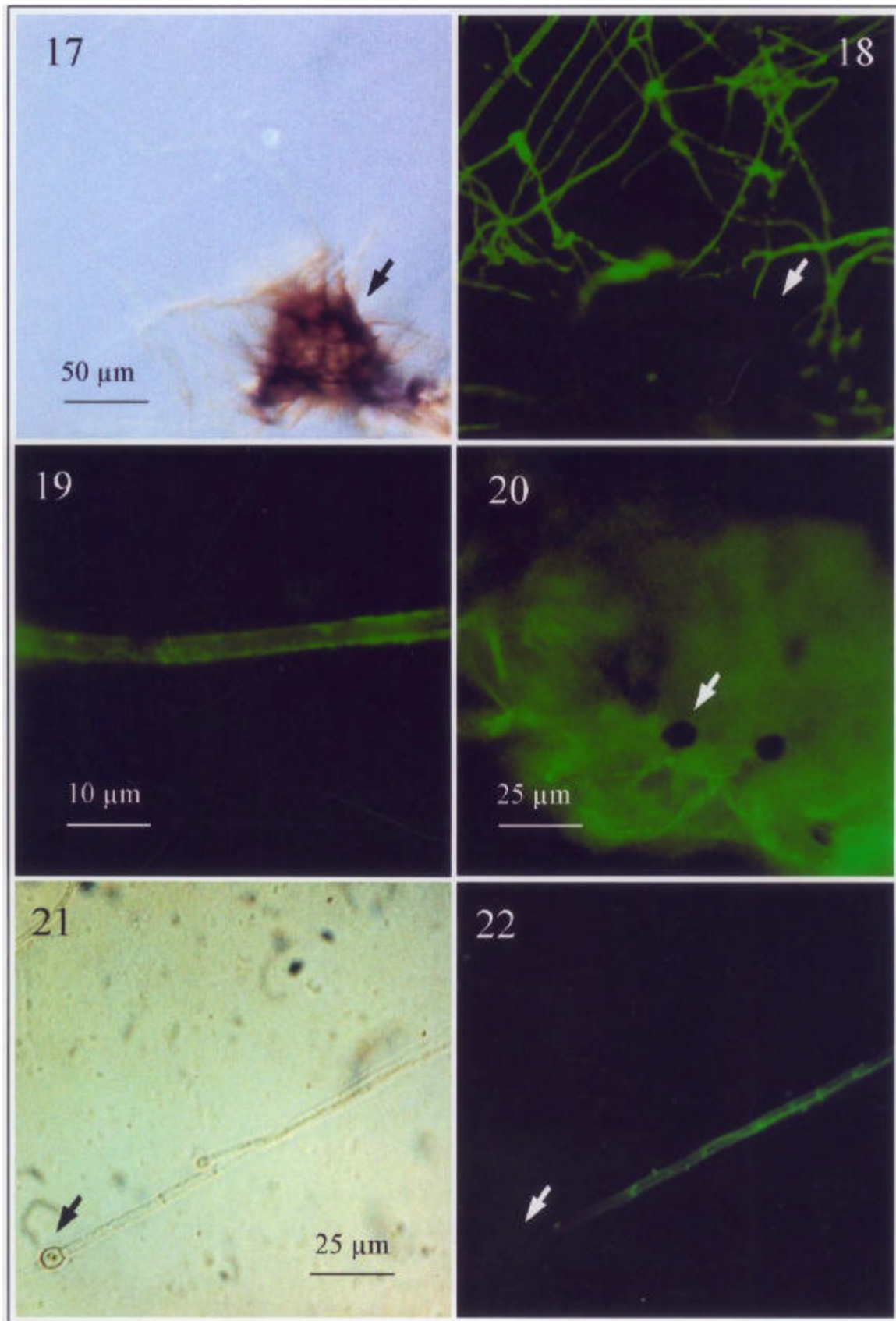
Abb. 18. Gleicher Bildausschnitt der Abb. 15 bei Epifluoreszenz: Hyphen aller Wachstumsstadien werden durch den monoklonalen Antikörper dekoriert, das Perithecium dagegen nicht (Pfeil, Immunfluoreszenzmarkierung mit FITC).

Abb. 19. Oberflächenantigene einer *C. globosum* Hyphe, dekoriert mit den primären und sekundären Antikörpern (Epifluoreszenzaufnahme, Immunfluoreszenzmarkierung mit FITC).

Abb. 20. Ascosporen und immunmarkierte Hyphen von *C. globosum*. Die Ascosporen werden durch den Antikörper nicht dekoriert (Pfeil, Epifluoreszenzaufnahme, Immunfluoreszenzmarkierung mit FITC).

Abb. 21. Hyphe und Chlamydospore von *T. harzianum* (Pfeil, Hellfeldaufnahme, Immunfluoreszenzmarkierung mit FITC).

Abb. 22. Gleicher Bildausschnitt der Abb. 19 bei Epifluoreszenz: im Gegensatz zu der Chlamydospore von *T. harzianum* werden die Hyphen dieses Pilzes durch den gegen *C. globosum* gerichteten Antikörper ebenfalls dekoriert (Pfeil, Immunfluoreszenzmarkierung mit FITC).



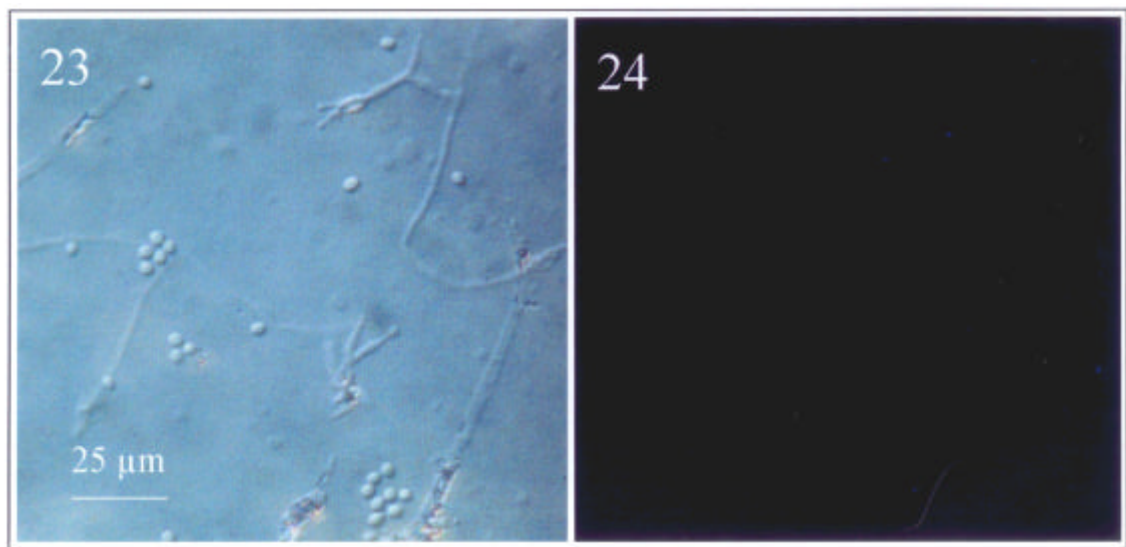


Abb. 23. Hyphen und Konidien von *Trichoderma* sp. Das Isolat wurde aus Erde gewonnen, die nach der Sterilisation durch Mikroorganismen wiederbesiedelt war (Hellfeldaufnahme, Immunfluoreszenzmarkierung mit FITC).

Abb. 24. Gleicher Bildausschnitt der Abb. 23 bei Epifluoreszenz. Dieses *Trichoderma*-Isolat zeigt keine Fluoreszenz und wird daher nicht mit dem gegen *Chaetomium globosum* gerichteten monoklonalen Antikörper dekoriert (Immunfluoreszenzmarkierung mit FITC).

Tabelle 3. Immunfluoreszenz (IMF)-Markierung von Hyphen verschiedener ausgewählter Pilze mit monoklonalen Antikörpern der Zelllinie 1-2C12-A7-E6.

Isolat	IMF	Isolat	IMF	Isolat	IMF
Kontrolle ¹ , Kontrolle ²	–	<i>Trichoderma</i> sp.	–	<i>Botrytis cinerea</i>	–
<i>Chaetomium globosum</i> ssc	+	<i>Fusarium graminearum</i>	–	<i>Ustilago</i> sp.	–
<i>C. funicola</i> ssc	+	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	–	<i>Microdochium nivale</i>	–
<i>C. elatum</i> ic-ce-5	+	<i>Alternaria</i> sp.	–	<i>Rhizoctonia solani</i>	–
<i>C. irregulare</i> ic-ce-7	–	<i>Cephalosporium</i> g.	–	<i>Epicoccum</i> sp.	–
<i>Trichoderma harzianum</i>	+	<i>Ascochyta rabiei</i>	–	<i>Gaeumannomyces</i> g.	–

¹ sekundäre Antikörperkontrolle, ² Kontrolle mit präimmunem Serum

3.2.2 Bestimmung der pilzlichen Biomasse mittels PTA-ELISA

Die Bestimmung der pilzlichen Biomasse in verschiedenen Pflanzenabschnitten im PTA-ELISA war aufgrund der konstitutiven Bildung des Pilzantigens in Hyphen aller Wachstumsstadien möglich. Untersucht wurde die Bildung der pilzlichen Biomasse des Isolats *Chaetomium globosum* ssc3 an bzw. in verschiedenen Pflanzenabschnitten. Die Pflanzenanzucht erfolgte dabei in den Kultursubstraten sterile Erde, unsterile Erde bzw. MS-Kultur. Ziel dabei war es, die von der Karyopse ausgehende Ausbreitung des Pilzes an bzw. in der Pflanze sowie seine Konkurrenzfähigkeit im Boden näher zu charakterisieren. Die Pilzmenge wurde anhand von Referenzverdünnungen des gefriergetrockneten Myzels ermittelt. Der ELISA-Wert verlief zwischen 70-200 µg Pilztrockengewicht pro ml linear zur Konzentration des gefriergetrockneten Myzels (Abb. 25).

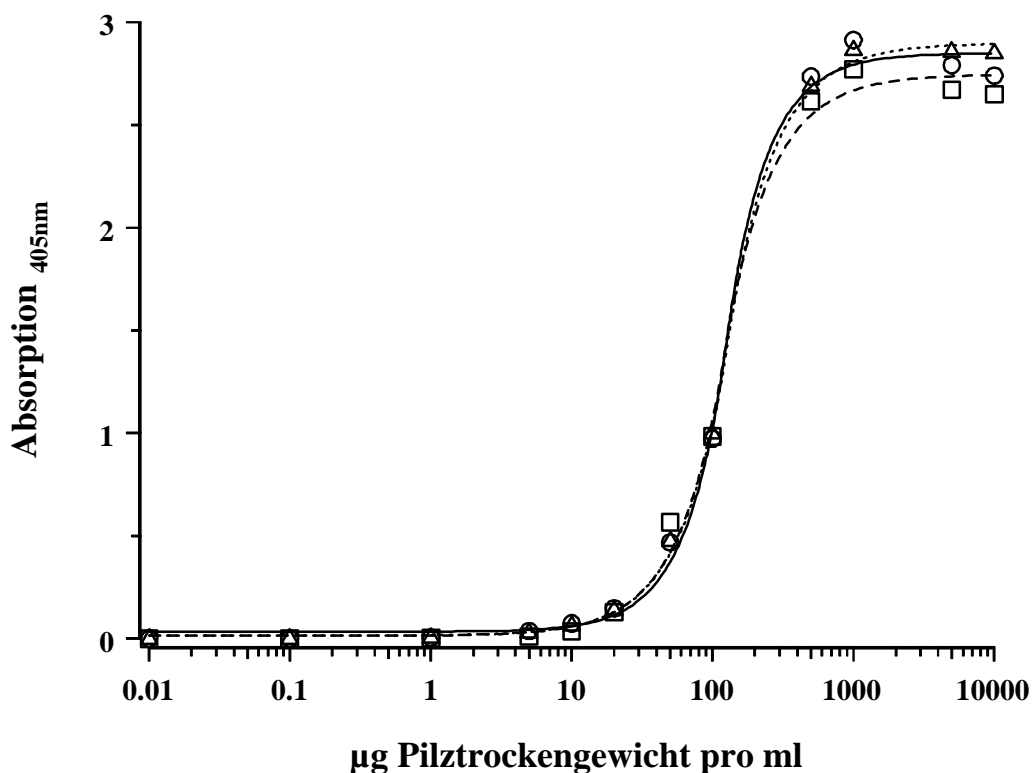


Abb. 25. Eichkurven mit verschiedenen Verdünnungsstufen des gefriergetrockneten Myzels von *Chaetomium globosum* im PTA-ELISA, hier dargestellt anhand von 3 unabhängigen Assays (Vierecke, Kreise und Dreiecke).

Mittels der Referenzverdünnungen konnte die Menge des an bzw. in der Pflanze gebildeten Pilzfrischgewichts errechnet werden. Die Nachweisgrenze des PTA-ELISA betrug 30 µg Pilztrockengewicht pro ml (Abb. 25). Bei einem Umrechnungsfaktor von 5,63 von Pilztrockengewicht zu Frischgewicht liegt diese Nachweisgrenze bei 170 µg Pilzfrischgewicht und stimmt mit der Nachweisgrenze des aufgereinigten Pilzproteins überein (s. 3.2.1.1). Durch die Gefriertrocknung konnte demnach keine Beeinträchtigung der antigenen Eigenschaften des Myzels festgestellt werden.

Die PTA-ELISA Resultate unbehandelter Kontrollpflanzen in steriler Erde bzw. in MS-Kultur waren immer negativ, d.h. es traten keine Kreuzreaktionen mit Pflanzeninhaltsstoffen auf. Wegen der Wachstumsdepressionen in steriler Erde wurde anfangs statt dieser eine autoklavierte und für 7 Tage gelagerte, d.h. eine mit Mikroorganismen wiederbesiedelte, Erde verwendet. Dabei zeigte sich im PTA-ELISA der unbehandelten Kontrollpflanzen allerdings falschpositive Werte, die auf eine Infektion der Pflanzen mit einem unbekannten Pilz (möglicherweise *Trichoderma* sp.) zurückgeführt wurden. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen werden deshalb nicht dargestellt. PTA-ELISA Resultate unbehandelter Kontrollpflanzen waren auch in unsteriler Erde in manchen Versuchen positiv, weshalb auch solche Versuche in die Auswertung nicht miteinbezogen wurden.

Mit *C. globosum* inokulierte Pflanzen wurden in Abhängigkeit der Anzuchtsmedien unterschiedlich stark besiedelt. In steriler Erde trat ein intensives Pilzwachstum mit 8 mg Pilzfrischgewicht pro Gramm Pflanzenfrischgewicht am/im Scutellum auf, wogegen in unsteriler Erde nur Werte von 1,8 mg Pilzfrischmasse erreicht wurden. In steriler Erde war außerdem eine Besiedlung des gesamten Wurzelsystems (1 mg Pilzfrischmasse pro Gramm Wurzelfrischgewicht) und eine Besiedlung des Coleoptilenbereiches (0,6 mg Pilzfrischmasse pro Gramm Sproßfrischgewicht) zu erkennen, die bei Anzucht in unsteriler Felderde völlig ausblieb (Abb. 26).

Bei beiden Anzuchsbedingungen, steriler und unsteriler Erde, kam es jedoch offensichtlich zu keiner Besiedlung der Blattspreiten (Abb. 26).

Die Pflanzenanzucht in MS-Kultur führte ebenfalls zu keiner Besiedlung der Blattspreiten, jedoch war das Pilzwachstum in Wurzeln, Scutellum und Coleoptile im Vergleich zur Anzucht in steriler Felderde 5 mal stärker (Abb. 26).

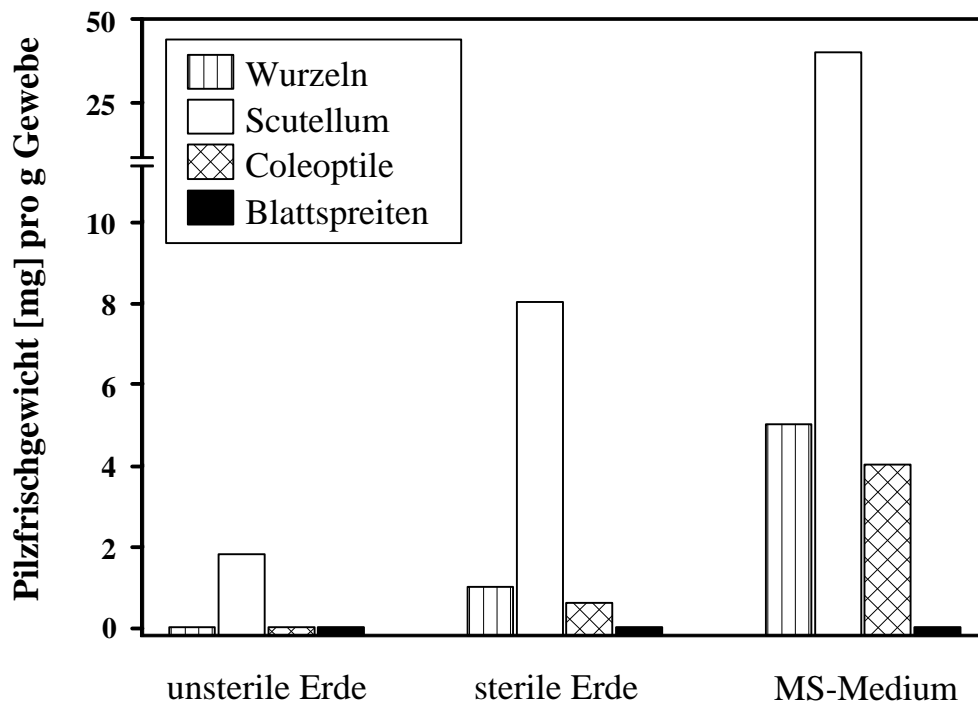


Abb. 26. Pilzfrischgewicht von *Chaetomium globosum* pro Gramm Pflanzenfrischgewicht unterschiedlicher Gewebe der Gerste in Abhängigkeit verschiedener Kultursubstrate (unsterile Erde, sterile Erde und MS-Kultur). Die Pilzfrischgewichtsbestimmung erfolgte mittels PTA-ELISA.

3.2.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen *C. globosum* und der Gerste

3.2.3.1 Tissue Print Immunoblot (TPI)

Mittels TPI sollte zwischen einer epiphytischen und einer endophytischen Besiedlung der verschiedenen Pflanzenabschnitte unterschieden und die mittels PTA-ELISA festgestellte Pilzbesiedlung der Pflanze überprüft werden. Es konnte wie im PTA-ELISA keine Besiedlung der Blattspreiten gefunden werden. Das Scutellum, sowie der Bereich der noch unentwickelten Sprossachse und der Bereich der Wurzelprimordien, also alle Zonen in Scutellumnähe, wurden unabhängig der Anzuchtsbedingungen (sterile Erde, unsterile Erde, MS-Kultur) epiphytisch besiedelt. In MS-Kultur führte eine Inokulation der Keimpflanzen mit *C. globosum* und eine nachfolgende 3-wöchige Pflanzenanzuchtsphase zu einer intensiven Pilzbesiedlung der Zellen der Wurzelrinde, was im TPI durch das großflächige Präzipitat des blauen Azofarbstoffs zu erkennen ist. Der Zentralzylinder blieb jedoch grundsätzlich besiedlungsfrei (Abb. 27).

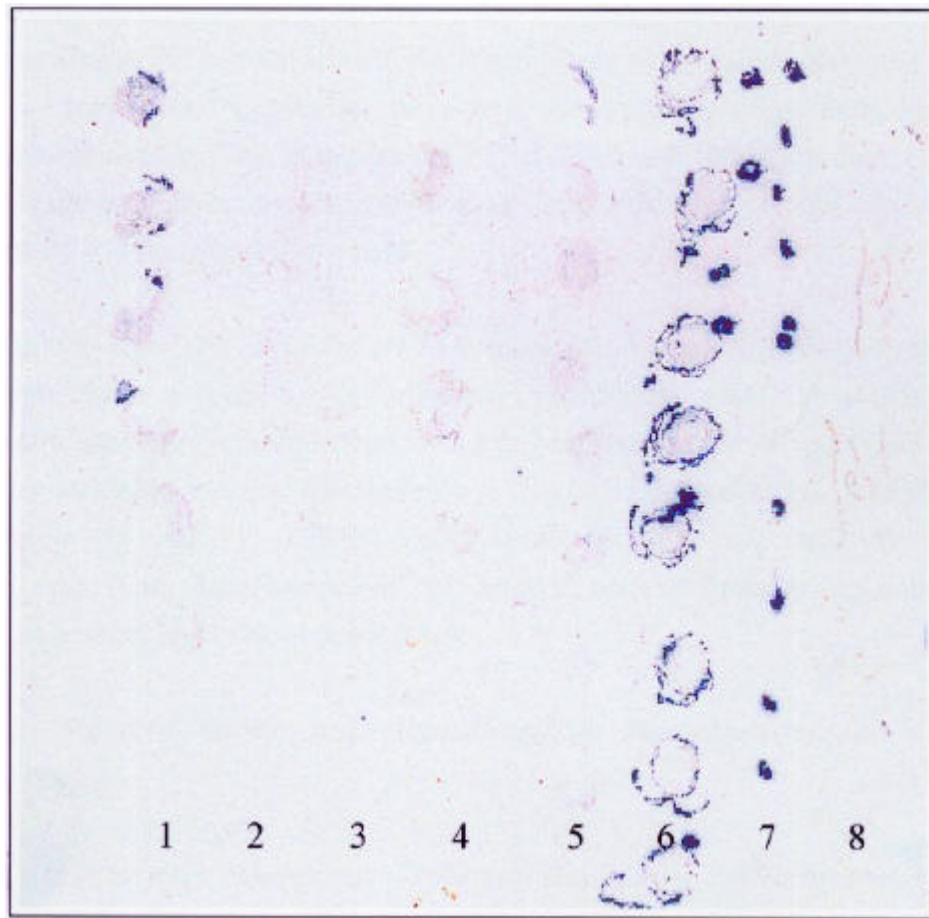


Abb. 27. Nachweis der Besiedlung des Gerstengewebes mit *Chaetomium globosum* im Tissue Print Immunoblot (TPI).

Die Pflanzenanzucht erfolgte entweder in MS-Kultur (Spalten 6-8) oder in autoklavierter, durch Mikroorganismen wiederbesiedelte Erde (Spalten 1-5). Die Pflanzen wurden transversal geschnitten und die Schnittfläche auf die Membran gepresst. Der Abdruck des Sprosses (Spalte 1, 4, 5, 6 und 8) bzw. der Wurzeln (Spalte 2, 3 und 7) erfolgte von oben nach unten fortlaufend von proximal nach distal. Das blaue Präzipitat verdeutlicht die epiphytische Besiedlung des bodennahen Bereichs der gestauchten Sproßachse von Pflanzen in wiederbesiedelter Erde durch *C. globosum* (Spalte 1). In den Spalten 3-5 wurden Pflanzen der unbehandelten Kontrollvariante abgedrückt. In den Spalten 6 und 7 zeigt sich die intensive epiphytische Besiedlung der gestauchten Sproßachse (Spalte 6) durch *C. globosum* und die intensive Ausbreitung in den Wurzeln (Spalte 7) bei Anzucht der Pflanzen in MS-Kultur.

3.2.3.2 Immunfluoreszenz (IMF)-Markierung

Die IMF diente dem spezifischen Nachweis von *C. globosum* Antigenen bzw. Hyphen auf cytologischer Ebene. Es wurden sowohl die Wurzeln, als auch die Scutellen und die Bereiche der noch unentwickelten Sproßachse transversal geschnitten und die Besiedlung durch *C. globosum* untersucht. Der Test bestätigte die PTA-ELISA und TPI Ergebnisse. Es konnte eine von den Pflanzenanzuchtsbedingungen abhängige variierende Intensität der Wachstums von *C. globosum in/ad planta* festgestellt werden.

Eine ausgeprägte inter- und intrazelluläre Besiedlung der Wurzel, d.h. des Cortexgewebes und der Epidermis, zeigte sich in der MS-Kultur mit *C. globosum*, wobei die im TPI festgestellte fehlende Besiedlung des Zentralzylinders auch hier bestätigt werden konnte (Abb. 28). In stark verminderter Intensität erfolgte die Besiedlung des Wurzelgewebes bei Anzucht in steriler Felderde (Abb. 30 und 31). Hierbei war sowohl die inter- wie auch die intrazelluläre Besiedlung von einer Autofluoreszenz der benachbarten Zellwände begleitet, die durch Emission von gelbem Licht charakterisiert war.

In unsteriler Felderde konnte keine Besiedlung des Wurzelgewebes mit *C. globosum* festgestellt werden.

Außerdem wurde in allen untersuchten Proben im Bereich der Zellwandverstärkten tertiären Endodermis und des Xylems, unabhängig von der Besiedlung mit *C. globosum* und unabhängig von der IMF-Markierung, eine gelbe Autofluoreszenz beobachtet (Abb. 29).

Unter allen Anzuchtsbedingungen wurden das Scutellum und die proximalen Bereiche des Sprosses entsprechend der Ergebnisse des TPI epiphytisch besiedelt. Eine die epiphytische Besiedlung begleitende sehr starke Autofluoreszenz der Epidermiszellwände zeigte sich, gemäß der endophytischen Besiedlung der Wurzeln, auch im Scutellum. In keiner der untersuchten Proben konnte einer Eindringung des Pilzes in das Scutellumgewebe festgestellt werden (Abb. 32).

Ebenfalls konnte, in Übereinstimmung mit dem PTA-ELISA und TPI, in keiner der untersuchten Proben eine Besiedlung der Blattspreiten gefunden werden.

Abb. 28-32. Besiedlung der Gerstenwurzeln durch *Chaetomium globosum* im Querschnitt.

Abb. 28. Intensive inter- und intrazelluläre (Pfeile) Besiedlung bis in tiefere Cortexschichten (Anzucht in MS-Kultur, Epifluoreszenzaufnahme, IMF-Markierung mit FITC, Semidünnschnitt).

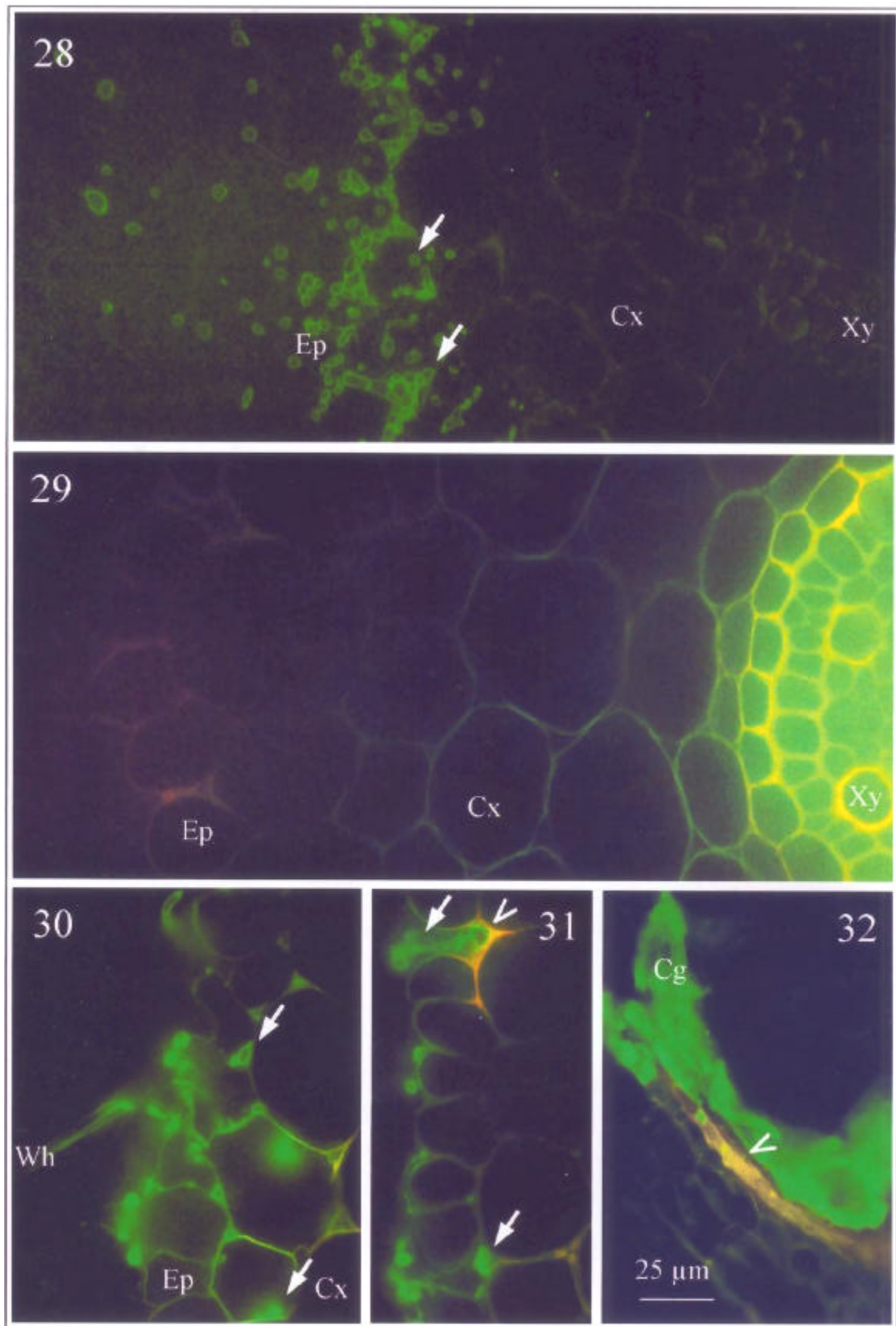
Abb. 29. Kontrolle ohne *C. globosum*. Der Zentralzylinder zeigt eine starke von der IMF-Markierung unabhängige Autofluoreszenz (Anzucht in steriler Erde, Epifluoreszenzaufnahme, IMF-Markierung mit FITC, Handschnitt).

Abb. 30. Inter- und intrazelluläre (Pfeile) Besiedlung der äußeren Wurzelschichten. (Anzucht in steriler Erde, Epifluoreszenzaufnahme, IMF-Markierung mit FITC, Handschnitt).

Abb. 31. Inter- und intrazelluläre (Pfeile) Besiedlung der äußeren Wurzelschichten. Die an die Hyphen angrenzenden Wirtszellwände zeigen eine Autofluoreszenz (Pfeilspitze; Anzucht in steriler Erde, Epifluoreszenzaufnahme, IMF-Markierung mit FITC, Handschnitt).

Abb. 32. Epiphytische Besiedlung des Scutellums. Auch hier zeigen die an die Hyphen angrenzenden Epidermiszellwände eine Autofluoreszenz (Pfeilspitze; Anzucht in steriler Erde, Epifluoreszenzaufnahme, IMF-Markierung mit FITC, Handschnitt).

Ep, epidermis; Cx, Cortex; Xy, Xylem; Wh, Wurzelhaar; Cg, *Chaetomium globosum*.



3.3 Einfluss der *Chaetomium globosum* Besiedlung auf das Pflanzenwachstum

Anhand des Pflanzenfrischgewichts sollte der Einfluß der Besiedlung der Wurzeln mit *C. globosum* auf das Pflanzenwachstum aufgezeigt werden. Hierfür wurden Frischgewichtsdaten sowohl aus der Pflanzenanzucht in MS-Kultur als auch aus der Anzucht in steriler Erde herangezogen. Da die Pflanzen aus der MS-Kultur grundsätzlich nach der Bestimmung des Pflanzenfrischgewichts für die Mehltauexperimente verwendet wurden, konnte keine Trennung des Frischgewichts in Wurzel- und Sprossfrischgewicht vorgenommen werden.

Bei Anzucht der Pflanzen in MS-Kultur war eine Wachstumsreduktion in der mit *C. globosum* besiedelten Variante auffällig (Abb. 33). Das Pflanzenfrischgewicht war verringert (Abb. 34) und bei Aufteilung des Gesamtgewichts in Sproß- und Wurzelgewicht war eine tendenzielle Wachstumsverschiebung in steriler Erde zugunsten des Wurzelsystems erkennbar (Abb. 34, ‚sterile Erde‘), die sich bei weiterführender Analyse des Wurzelwachstums in MS-Kultur mittels einer Bestimmung der Wurzellänge, des Wurzelvolumens und des Wurzeldurchmessers bestätigte. Die Länge nahm bei gleichzeitig verringertem Durchmesser zu, während das Volumen jedoch unverändert blieb (Abb. 35).

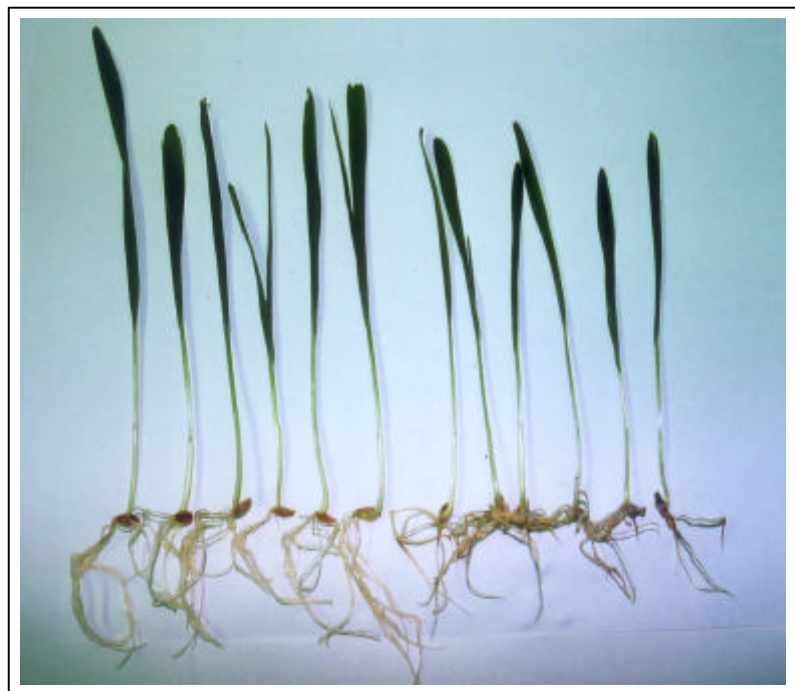


Abb. 33. Einfluß einer *Chaetomium globosum* Besiedlung der Gerstenwurzeln auf das Pflanzenwachstum. Im Gegensatz zur axenischen Kontrolle (6 Pflanzen von links) weisen die mit *Chaetomium globosum* besiedelten Pflanzen (rechts) in MS-Kultur ein verringertes Wachstum auf.

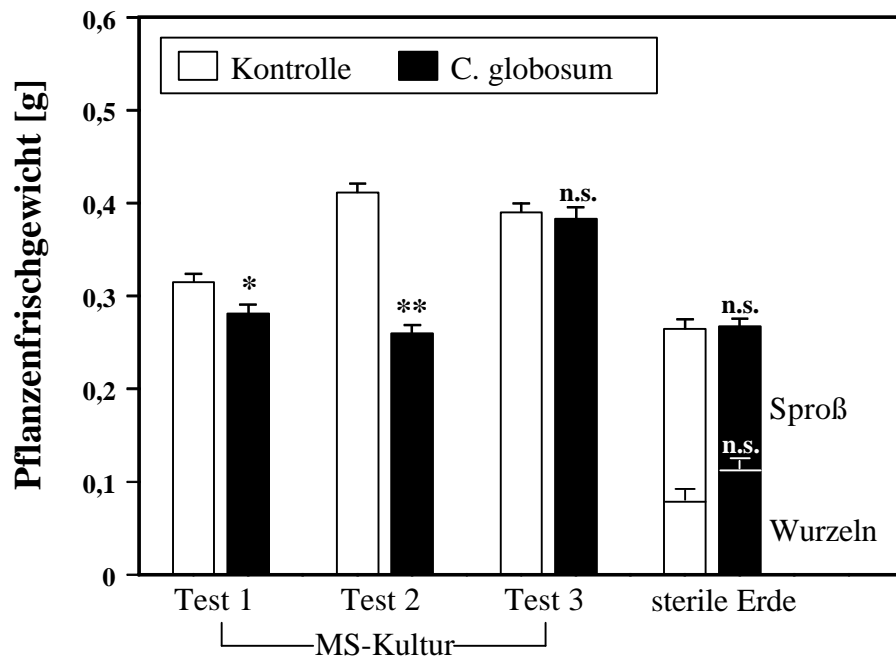


Abb. 34. Einfluß einer Besiedlung der Gerstenwurzeln durch *Chaetomium globosum* in MS-Kultur bzw. steriler Erde auf das Pflanzenwachstum in vier voneinander unabhängigen Versuchen (Mittelwerte + S.E.M., n=30).

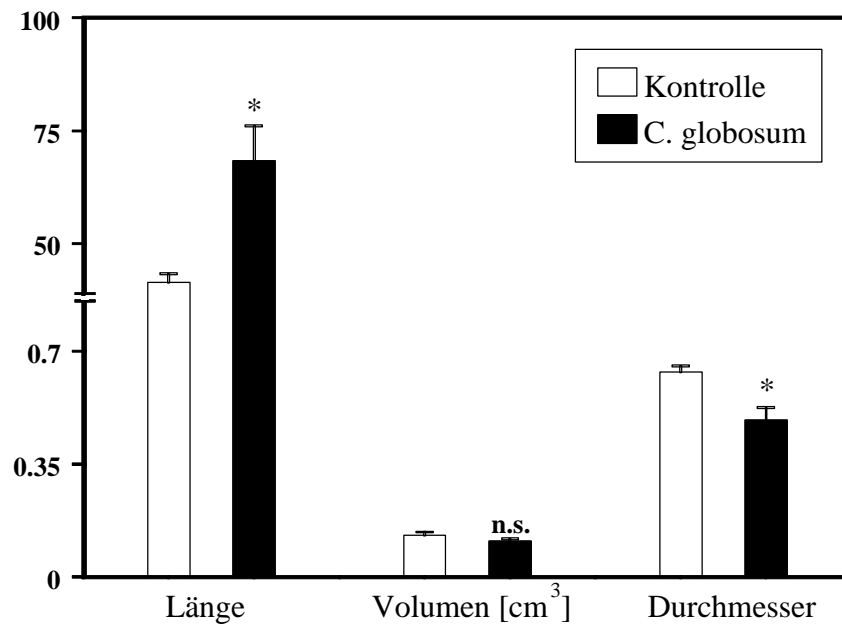


Abb. 35. Einfluß einer Besiedlung der Gerstenwurzeln durch *Chaetomium globosum* in MS-Kultur auf das Wurzelwachstum (Mittelwerte + S.E.M., n=10).

3.4 Strukturelle und physiologische Veränderungen der Wurzeln

Bei Anzucht der Pflanzen in MS-Kultur waren Abwehrreaktionen der Pflanzen gegen die Besiedlung mit *C. globosum* in Form von Verbräunungen der Wurzeln sichtbar. Im Gegensatz dazu konnten in steriler Erde makroskopisch keine Symptome festgestellt werden. Jedoch zeigte sich in den IMF-Untersuchungen eine endophytische Besiedlung des Wurzelgewebes durch *C. globosum*. Um diese gegensätzlichen Beobachtungen zu erklären, wurde die Interaktion zwischen Pflanze und Pilz auf histologischer Ebene näher untersucht. Hierfür wurden Hand- und Semidünnschnitte der Wurzeln aus beiden Anzuchtssystemen hergestellt. Verschiedene Färbetechniken sollte eine Interpretation der Wechselwirkung ermöglichen.

1) An Handschnitten der mit *C. globosum* besiedelten Wurzeln in steriler Erde wurde eine Vitalitätsfärbung mit DiOC₇(3) durchgeführt und die Vitalität der Epidermiszellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. 2) Eine Toluidinblau-Färbung von Semidünnschnitten der mit *C. globosum* besiedelten Wurzeln aus MS-Kultur sollte einen Hinweis auf die während der Abwehrreaktion gebildeten Substanzen liefern. Ohne Farbstoffzusatz wurden Lichtmikroskopisch die Verbräunungsreaktionen der besiedelten Wurzeln in MS-Kultur mit der symptomlosen Besiedlung der Wurzeln in steriler Erde verglichen.

Die Färbung der mit *C. globosum* besiedelten Wurzeln mit DiOC₇(3) verdeutlichte den Verlust der Epidermisvitalität. Die fehlende Fluoreszenz war lokal auf die mit *C. globosum* besiedelten Epidermisbereiche beschränkt (Abb. 37). Die unbesiedelten Epidermiszellen zeigten dagegen eine starke Fluoreszenz (Abb. 36).

Eine Färbung der besiedelten Wurzeln mit Toluidinblau verdeutlichte die Einlagerung von unbekannten Substanzen in die Zellwände und in den Interzellularraum. Diese Substanzen führten zu einem Farbwechsel des Farbstoffs von violett zu gelbgrün (Metachromasie). Der Farbwechsel war insbesondere in Bereichen papillenförmiger oder hemisphärischer Zellwandauflagerungen, jedoch auch in begrenzten Bereichen des Interzellularraumes zu erkennen (Abb. 41 und 42). Auffallend war die unmittelbare Nähe der anamorphen Substanzen zu *C. globosum* Hyphen. In manchen Fällen konnte eine offensichtliche Einschränkung der Ausbreitung von *C. globosum* im Gewebe aufgrund dieser Substanzen festgestellt werden (Abb. 42).

Bei lichtmikroskopischer Auswertung der besiedelten Wurzeln in MS-Kultur konnte eine Einlagerung braun gefärbter Verbindungen in die Zellwände festgestellt werden (Abb. 38). Diese Braunfärbung führte offensichtlich zu dem äußeren Erscheinungsbild des verbräunten Wurzelsystems. Die Wurzeln aus steriler Erde wiesen in besiedelten Regionen ebenfalls leichte Verbräunungen auf (Abb. 40), die jedoch makroskopisch nicht erkennbar waren. Mit der

Pilzbesiedlung einhergehend konnten in diesen Zellen hemisphärische und papillenförmige Zellwandauflagerungen gemäß den Beobachtungen in MS-Kultur gefunden werden (Abb. 39 und 40).

Abb. 36-42. Strukturelle und physiologische Veränderungen in den mit *Chaetomium globosum* besiedelten Gerstenwurzeln.

Abb. 36. Vitale Epidermis einer unbesiedelten Wurzel (Anzucht in steriler Erde, Epifluoreszenzaufnahme, Vitalitätsfärbung mit DiOC₇ (3), Handschnitt).

Abb. 37. Die Epidermis fluoresziert nur noch schwach, wodurch ein Vitalitätsverlust bedingt durch eine Veränderung des Membranpotentials dieses Gewebes angezeigt wird. Die Epidermis wird gleichzeitig durch vitale *C. globosum* Hyphen (Pfeil) epiphytisch besiedelt (Anzucht in steriler Erde, Epifluoreszenzaufnahme, Vitalitätsfärbung mit DiOC₇(3), Handschnitt).

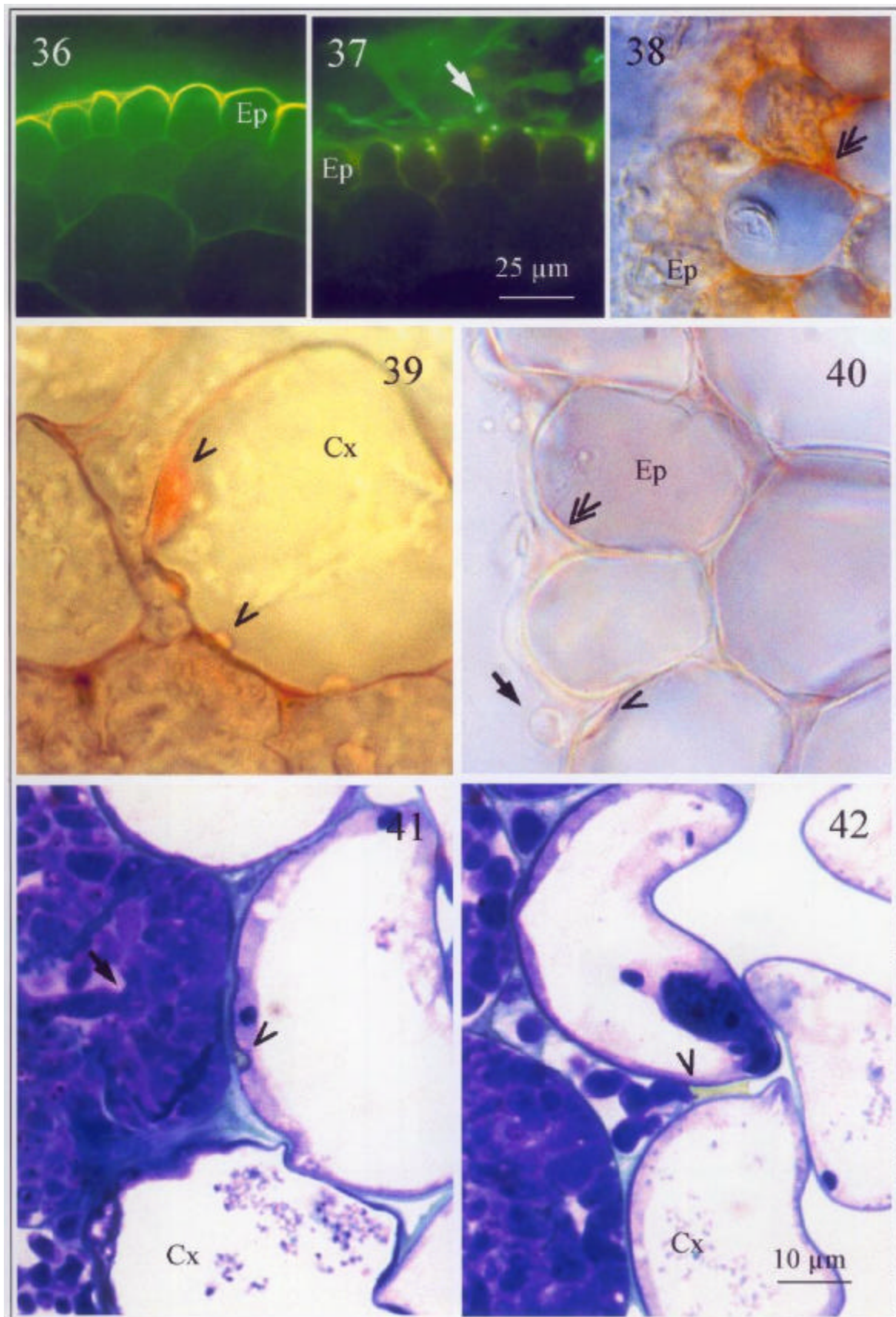
Abb. 38. Intensive Verbräunung der Cortexzellwände (Doppelpfeil) durch die Besiedlung des Wurzelsystems mit *C. globosum* (Anzucht in MS-Kultur, Hellfeldaufnahme, Handschnitt).

Abb. 39. Hemisphärische und papillenförmige Zellwandauflagerungen (Pfeilspitzen) in unmittelbarer Nähe zu *C. globosum* Hyphen (Anzucht in MS-Kultur, Hellfeldaufnahme, Handschnitt)

Abb. 40. Hemisphärische Zellwandauflagerungen (Pfeilspitze) und leichte Verbräunungen der Epidermiszellwände (Doppelpfeil) in unmittelbarer Nähe zu *C. globosum* Hyphen (Pfeil; Anzucht in steriler Erde, Hellfeldaufnahme, Handschnitt).

Abb. 41 und 42. Einlagerung von unbekannten Substanzen in die papillenförmige Ausstülpung der Zellwand (Abb. 41, Pfeilspitze) und in den Interzellularraum (Abb. 42, Pfeilspitze). Benachbarte Zellen sind vollständig mit *C. globosum* Hyphen ausgefüllt (Abb. 41, Pfeil; Anzucht in MS-Kultur, Hellfeldaufnahme, Toluidinblau-Färbung, Semidünnschnitt).

Ep, epidermis; Cx, Cortex.



3.5 Einfluß von *Chaetomium globosum* auf den Befall mit *Erysiphe graminis*

3.5.1 Bedeutung der Anzuchtsbedingungen

In den hier vorliegenden Untersuchungen zur Befallsreduktion des Echten Mehltaus wurden zunächst Pflanzen in unsteriler Felderde verwendet. Das Saatgut wurde vor der Anzucht mit einer *C. globosum* Ascosporensuspension behandelt und die Pflanzen nach einer Anzuchtphase von 14 Tagen mit Mehltau inokuliert. Nach weiteren 5-6 Tagen wurde der Befall der Primärblätter mit Mehltau bonitiert. Es konnte in diesem Anzuchtssystem keine Befallsreduktion reproduziert werden (Abb. 43). In zwei von vier Versuchen konnte eine Befallsreduktion aufgezeigt werden, während in den weiteren zwei Versuchen die Pflanzen sogar eine erhöhte Kolonienanzahl aufwiesen.

Wurde die Pflanzenanzucht dagegen in der MS-Kultur durchgeführt, die Pflanzen dabei nach der Anzuchtperiode in ein Kultursubstrat ausgepflanzt und dann mit Mehltau inokuliert, konnte in jedem Versuch eine Befallsreduktion festgestellt werden (Abb. 44).

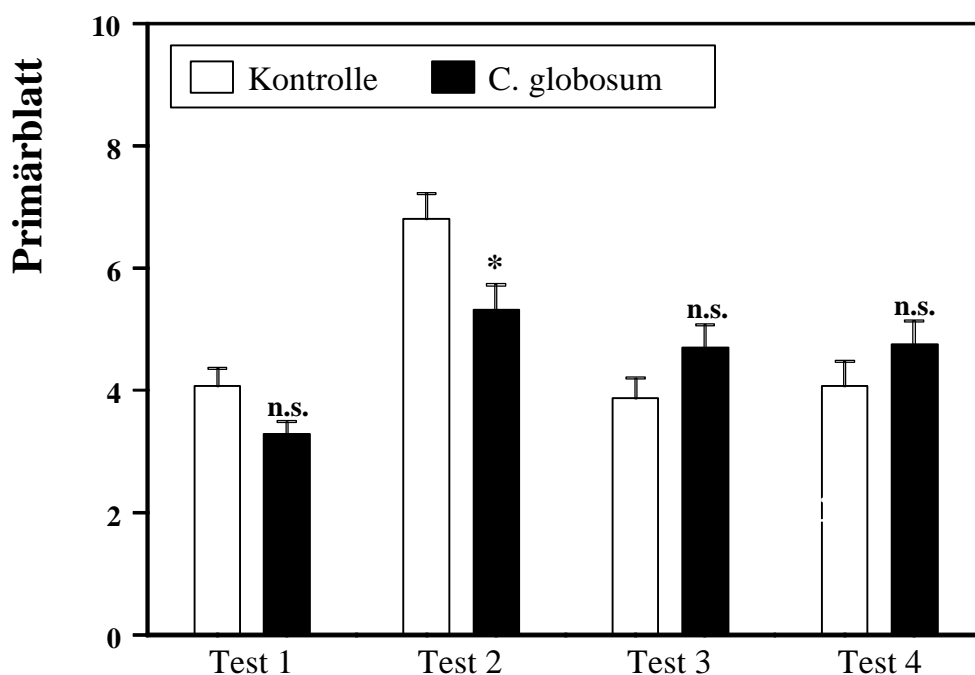


Abb. 43. Einfluß einer *Chaetomium globosum* Besiedlung des Scutellums auf den Befall der Gerste mit *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in vier voneinander unabhängigen Tests (Mittelwerte + S.E.M., n=30).

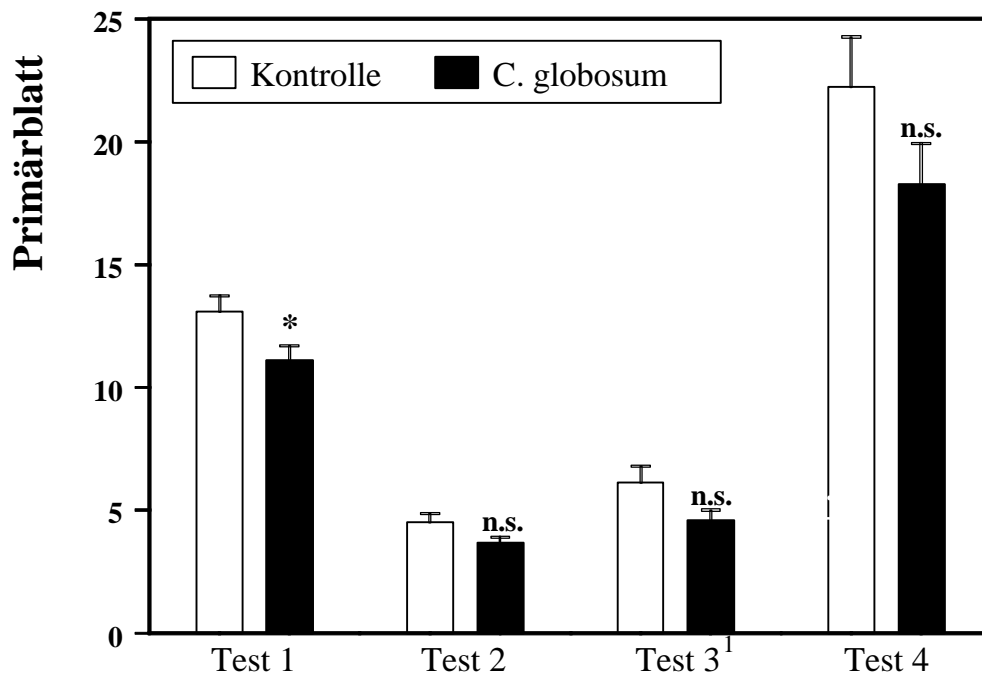


Abb. 44. Einfluß einer *Chaetomium globosum* Besiedlung der Wurzeln und des Scutellums auf den Befall der Gerste mit *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in vier voneinander unabhängigen Tests (Mittelwerte + S.E.M., n=30, ¹n=10).

Die Pflanzen wiesen in allen Versuchen eine reduzierte *E. graminis* Kolonienanzahl in der mit *C. globosum* besiedelten Variante auf. Diese Befallsreduktion konnte jedoch nur in einem von vier Versuchen statistisch abgesichert werden (Abb. 44, Test 1).

3.5.2 Ursachen der Befallsminderung

Für die Charakterisierung der Wirkungsmechanismen der Befallsreduktion von *E. graminis* an Gerste durch eine Vorbehandlung mit *C. globosum* wurden die Ursachen der Befallsminderung untersucht. Dafür wurden sowohl die Pathogenentwicklung als auch die Pathogenreproduktion auf den Primärblättern der Gerste analysiert. Die Pflanzenanzucht erfolgte hierfür in MS-Kultur. Für die Mehltauinokulation wurden die Pflanzen 24 h vor Inokulationstermin dem MS-Medium entnommen und in Einheitserde gepflanzt.

Der Infektionsverlauf von *E. graminis* erfolgt nach der Anhaftung der Konidien auf der Epidermis nach einem festgelegten zeitlichen Ablauf. Nach der Bildung eines Primärkeimschlauchs 3-3,5 h nach Inokulation der Primärblätter folgte eine

Appressorienbildung nach ca. 10 h und eine Ausformung der Primärhaustorien in den Epidermiszellen ca. 25 h nach Inokulation, wodurch die obligat biotrophe Phase des Pathogens eingeleitet ist (Abb. 3, S. 4).

Unterschiede im Infektionsverlauf von *E. graminis* f. sp. *hordei*, bedingt durch die Besiedlung der Wurzeln mit *C. globosum*, wurden mikroskopisch anhand der Konidienkeimung, der Appressorienbildung und der Haustorienbildung (erfolgreiche Etablierung des Pathogens) untersucht. Außerdem wurde die Intensität der Autofluoreszenz der in unmittelbarem Kontakt zum Appressorium stehenden Epidermiszellwand gemessen, um mögliche Abwehrreaktionen des Wirtes gegen das Pathogen zu erfassen.

Es zeigten sich keine Unterschiede im Infektionsverlauf und in der Pathogenabwehr. Durch die Vorinokulation mit *C. globosum* war sowohl die Konidienkeimung auf den Blättern der Gerste, als auch der Anteil der Konidien mit Appressorien nicht reduziert. Die für die Weiterentwicklung des Pathogens nötige Bildung der Haustorien war ebenfalls nicht beeinflusst. Darüber hinaus waren auch die Abwehrreaktionen des Wirtes gegen das Pathogen in Form von fluoreszierenden Zellwandinlagerungen nicht modifiziert (Tab. 5).

Unterschiede in der Reproduktivität von *E. graminis* konnten ebenfalls nicht festgestellt werden. Die als Maß für die Reproduktivität ausgewertete Anzahl gebildeter Konidien pro Kolonie war durch die Infektion der Wurzeln mit *C. globosum* nicht verringert. Es konnte jedoch eine leicht verringerte Konidienanzahl pro cm² Blattfläche festgestellt werden, was die verringerte Koloniendichte widerspiegelt (Tab. 4).

Die mikroskopischen Untersuchungen des Infektionsverlaufs lieferten den Hinweis auf eine beeinflusste Konidienanhaftung nach Inokulation mit *E. graminis*. Wurde zum Zeitpunkt der Bildung der Primärhaustorien (41 h nach Inokulation) die Anzahl der nach Inokulation mit *E. graminis* dem Blatt anhaftenden Konidien ausgewertet, ergab sich eine um 50 % verringerte Konidiendichte pro cm² Blattfläche in der mit *C. globosum* inokulierten Variante (Abb. 45).

Tabelle 4. Einfluß einer *Chaetomium globosum* Besiedlung der Wurzeln und des Scutellums der Gerste auf die Sporulation von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. 10 Tage nach Inokulation mit *E. graminis* wurde die Konidienbildung nach 48 h ausgewertet (n=7).

Behandlung	Konidienbildung nach 48 h	
	pro cm Blattfläche	pro Kolonie
Kontrolle	15308	1321
<i>Chaetomium globosum</i>	12655	1246
p - Wert	0,837	0,392

Tabelle 5. Einfluß einer *Chaetomium globosum* Besiedlung der Wurzeln und des Scutellums der Gerste auf die Pathogenentwicklung von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* und auf die Abwehrreaktionen der Pflanze, gemessen am Anteil der Penetrationsstellen mit Autofluoreszenz der Zellwände (n=10).

Infektionsstadien [%]	Behandlung		p - Wert
	Kontrolle	<i>C. globosum</i>	
Konidienkeimung	14,6	19,1	0,254
Konidien mit Appressorien	55,9	67,1	0,253
Appressorien mit Haustorien	65,0	67,3	0,793
Pathogenabwehr:			
Anteil der Penetrationsstellen mit			
Zellwandautofluoreszenz [%]	44,3	37,5	0,317

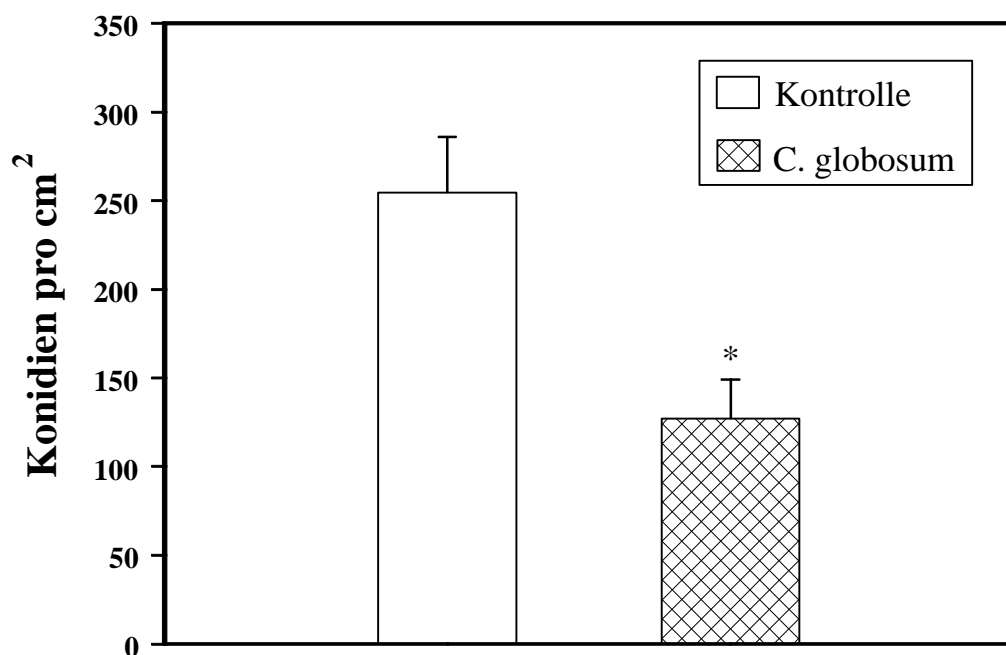


Abb. 45. Einfluß einer *Chaetomium globosum* Besiedlung der Wurzeln und des Scutellums der Gerste auf die Konidienanhaftung von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* an die Primärblätter (Mittelwerte + S.E.M., n=10).

4 Diskussion

4.1 Oberflächensterilisation

Es ist bekannt, daß Pilzsporen relativ kurze Einwirkzeiten biotischer oder abiotischer Stressoren, wie im vorliegenden Fall die Sterilisationsmittel, überdauern können. In manchen Fällen kann die Sporenkeimung sogar durch die Stresseinwirkung verstärkt werden, wenn nach der Einwirkung günstige Lebensbedingungen eintreten (WALTHER & GINDRAT 1987). Eine ausreichend hohe Konzentration des Sterilisationsmittels und eine dadurch bedingte Abtötung aller an der Pflanzenoberfläche anhaftenden Hyphen oder Sporen eines zu untersuchenden Pilzes ist deshalb die wichtigste Voraussetzung für den Nachweis einer endophytischen Besiedlung der Pflanze durch den Pilz. Solche Studien setzen daher eine effektive Methode für die Oberflächensterilisation voraus. Die Effektivität der Methode kann nach erfolgter Oberflächensterilisation mittels eines Gewebeabdrucks auf ein geeignetes Kulturmedium überprüft werden. Mikroorganismen, die durch Oberflächenstrukturen, z.B. Vertiefungen im pflanzlichen Gewebe, geschützt sind, werden jedoch durch diese Methode jedoch nicht immer ausreichend erfaßt.

Mittels einer Standardmethode zur Oberflächensterilisation des Gerstengewebes (N-3,5; CROUS et al. 1995) wurde zunächst eine mögliche endophytische Besiedlung des Gewebes mit *C. globosum* untersucht. *C. globosum* schien tatsächlich den Sproß und die Wurzeln endophytisch zu besiedeln. Histologische Untersuchungen an Gewebeteilen, die ein solches Hyphenwachstum aufwiesen, zeigten jedoch eine Gewebebesiedlung, die auf oberflächlich anhaftende Ascosporen zurückzuführen war (Abb. 6 - 10). Die weiterführenden histologischen Untersuchungen verdeutlichten, daß nur solche Gewebeteile durch ein Hyphenwachstum gekennzeichnet waren, die auf PDA ausgelegt und für einige Tage inkubiert worden waren. Gewebeteile, die direkt für die Mikroskopie aufgearbeitet wurden, wiesen keine Pilzbesiedlung auf. Es wurde deshalb angenommen, daß die beobachtete Besiedlung des Gewebes durch *C. globosum* ausschließlich von auskeimenden Ascosporen ausgegangen war. Sie hatten offensichtlich die Oberflächensterilisation überlebt. Eine Besiedlung der auf Agar ausgelegten Gewebesegmente durch *C. globosum* erfolgte demnach, bedingt durch die unvollständige Oberflächensterilisation, saprophytisch und nicht endophytisch.

Durch die Unzulänglichkeit der Methode N-3,5 mußte eine effektive Tauchbehandlung erarbeitet werden, um die Abtötung aller an der Pflanzenoberfläche anhaftenden Ascosporen von *C. globosum* zu erreichen. Da die Überprüfung der Effektivität durch ein Gewebeabdruck des behandelten Pflanzenmaterials aus den oben genannten Gründen als nicht ausreichend

erachtet wurde, galt es eine neue Methode zu entwickeln, mit der eine möglichst effektive Oberflächensterilisation erreicht werden konnte.

Zunächst wurde die Wirkung verschiedener Tauchbehandlungen (Ethanol in Verbindung mit NaOCl oder Peressigsäure) auf die Vitalität der Ascosporen von *C. globosum* getestet ('Ascosporenvitalitätstest auf Nitrocellulosemembranen'). Bei einer solchen Behandlung der Ascosporen von *Chaetomium* spp. auf Nitrocellulosemembranen waren relativ hohe Konzentrationen der Sterilisationsmittel bzw. ausgedehnte Einwirkzeiten für eine effektive Reduktion der Ascosporenkeimung (< 1 % gekeimte Ascosporen) notwendig. Dazu mußte die Konzentration von NaOCl auf mehr als 2 % NaOCl und die von Peressigsäure auf mehr als 5 % eingestellt werden. Auf der anderen Seite kann statt dessen die Einwirkzeit von Ethanol (95 %) auf 5 min ausgedehnt werden (Tab. 2, S. 32). Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von FISHER et al. (1991) überein, welche eine vergleichbare Tauchbehandlung für eine effektive Reduktion der Sporenkeimung von *Sporormiella intermedia*, *Tricladium splendens* und *Cylindrocarpon destructans* benötigten. In anderen Fällen genügte dagegen schon eine 5 minütige Tauchbehandlung mit 50 %igem Ethanol für eine effektive Reduktion der Sporenkeimung von *Fusarium*, *Alternaria* und *Epicoccum* sp. (SCHULZ et al., 1993). Um die Diffusion der Reagenzien in das Gerstengewebe zu reduzieren, wurde eine kürzere Einwirkzeit bei höheren Konzentrationen der Reagenzien gewählt.

Nach den hier vorliegenden Ergebnissen aus den Ascosporenvitalitätstests auf Nitrocellulosemembranen hätte demnach eine Tauchbehandlung mit N-3,5 ausreichend sein müssen, um die oberflächlich am Gerstengewebe anhaftenden Ascosporen abzutöten. Deshalb wurde in einem weiteren Test ('Vitalitätstest für Ascosporen die axenischer Gerste anhaften') die Effektivität der Tauchbehandlungen erneut getestet. Es wurden axenisch angezogene Pflanzen in eine Ascosporensuspension von *C. globosum* getaucht und danach die Wirksamkeit der Oberflächensterilisationsmittel *ad planta* getestet. Hierfür wurden die Tauchbehandlungen N-3,5, N-9, P-5 und P-10 ausgewählt (Tab. 2).

Die Untersuchungen zur Wirksamkeit der Tauchbehandlungen bei Verwendung von Ascosporen, die dem Pflanzengewebe anhaften, zeigten jedoch eine unzureichende Effektivität fast aller getesteten Tauchbehandlungen, die auf Nitrocellulosemembranen gewirkt hatten. Nur die Tauchbehandlung P-10 mit Peressigsäure zeigte eine ausreichende Wirksamkeit am Pflanzengewebe. Die Behandlung des Gewebes mit N-3,5 führte zwar zu einer verzögerten Ascosporenkeimung, aber nicht zu einer Abtötung. Dieser Effekt kann nicht allein durch die hohe Konzentration des Oxidationsmittels erklärt werden, da eine ähnliche Konzentration von 9 % aktivem Chlor in der NaOCl-Lösung nicht zu einer vollständigen Abtötung der Ascosporen auf der Pflanzenoberfläche führte. Eine Erklärung ist in der Azidität (pH 1) des

Sterilisationsmittels zu suchen, welches möglicherweise die Eindringung des Oxidationsmittels in die Sporen erleichtern konnte.

Die hier gefundene Keimverzögerung der Ascosporen, die durch die Behandlung des Gewebes mit N-3,5 ausgelöst wurde, kann durch die Schaffung ungünstiger Lebensbedingungen erklärt werden. Auch CHAPMAN & FERGUS (1975) konnten zeigen, daß eine Keimverzögerung der *Chaetomium* spp. Ascosporenkeimung durch abiotischen Stress hervorgerufen werden kann. Es könnte demnach auch hier von einer Stresseinwirkung, bedingt durch die Behandlung der Sporen mit N-3,5, gesprochen werden.

Grundsätzlich war eine Tauchbehandlung der Ascosporen auf Nitrocellulosemembranen bei geringeren Konzentrationen des Oxidationsmittels effektiv, als bei Tauchbehandlung der Ascosporen *ad planta*. Wahrscheinlich sind Oberflächenstrukturen des Pflanzengewebes für die verminderte Wirksamkeit der Reagenzien verantwortlich. Lipide, Glycoproteine oder Lipoproteine liefern Substrate für eine Oxidationsreaktion mit den Sterilisationsreagenzien, wodurch die verfügbare Konzentration aktiver Substanzen zur Abtötung der Ascosporen herabgesetzt wird. Außerdem könnten pilzliche Oberflächenstrukturen wie Fimbriae oder Hydrophobine den Kontakt der Ascosporen zur Pflanzenoberfläche erleichtern, wodurch für die Sporen ein schützendes Milieu erreicht wird. Solche Mechanismen sind bei Erkennungs- und Anheftungsreaktionen in Zell-Zell Interaktionen bekannt und bei der Wirtserkennung phytopathogener Pilze (DAY & GARDINER 1987, TEMPLETON et al. 1994, WESSELS 1994) sowie bei der Morphogenese der Pilze (WESSELS 1991 und 1997) beschrieben worden. Für diesen Erklärungsansatz spricht ebenfalls die höhere Besiedlungsrate auf den Blattsegmenten im Vergleich zu den Wurzelsegmenten. Fimbriae/Hydrophobine vermitteln einen besseren Kontakt zur Blattoberfläche, welche im Gegensatz zur hydrophilen Wurzeloberfläche stark hydrophob ist. Dadurch waren die Tauchbehandlungen der Blätter weniger wirksam als die Tauchbehandlungen der Wurzeln.

Mit der Oberflächensterilisation durch Peressigsäure in der Tauchbehandlung P-10 konnte demnach eine effektive Methode zur Abtötung oberflächlich dem Gewebe anhaftenden Ascosporen von *C. globosum* gefunden werden. Diese Methode wurde deshalb für die Überprüfung der endophytischen Besiedlung der Gerste mit *C. globosum* verwendet. Es wurden sowohl Pflanzen aus der MS-Kultur, als auch Pflanzen aus steriler Erde verwendet. Die histologischen und serologischen Untersuchungen zum Wachstum von *C. globosum in planta* zeigten, daß die Besiedlung des Gewebes im MS-Medium bis in viel tiefere Cortexschichten vordrang, als dies in steriler Erde der Fall war (Abb. 28 und 30). Trotzdem mußte durch die Oberflächensterilisation ein Wachstum *in planta* für beide Pflanzenanzuchtsmedien nachweisbar sein. Nachgewiesen werden konnte jedoch lediglich das Wachstum *in planta* in MS-Kultur. Hier zeigten 20 % der nach der Tauchbehandlung P-10

ausgelegten Wurzelsegmente eine Besiedlung mit *C. globosum*. Die endophytische Besiedlung der Wurzeln in steriler Erde konnte mit P-10 jedoch nicht nachgewiesen werden. Es galt daher die Eindringtiefe der Sterilisationsmittel genauer zu untersuchen.

Anhand der Vitalitätsfärbung mit DiOC₇(3) konnte die Eindringung der Sterilisationsmittel der Tauchbehandlung P-10 in das Wurzelgewebe aufgezeigt werden. Die Sterilisationsmittel drangen bis in die Epidermis der Wurzel ein und töteten die dort angesiedelten Hyphen ab (Abb. 13 und 14). Da die endophytische Besiedlung des Wurzelgewebes durch *C. globosum* in steriler Erde in der Epidermis lokalisiert war, konnte diese Besiedlung durch die Oberflächensterilisation nicht nachgewiesen werden.

Eine Oberflächensterilisation, die dem Gewebe anhaftende Ascosporen abtötet, jedoch nicht in das Gewebe eindringt, konnte demnach in den hier vorliegenden Untersuchungen nicht gefunden werden. Die Studien zur endophytischen Besiedlung des Wurzelgewebes durch *C. globosum* stützten sich deshalb auf die Anwendung histologischer Methoden.

Eine Eignung der Tauchbehandlung P-10 für stabileres Pflanzenmaterial, wie etwa holziges oder verkorktes Gewebe wäre jedoch zu prüfen und könnte, mit Aussicht auf eine ausreichende Wirksamkeit gegen oberflächlich anhaftende Ascosporen, erfolgversprechend sein. Ebenso wäre die Nutzung der Methode für den Nachweis einer endophytischen Besiedlung des Blattgewebes zu untersuchen. Hier könnten die hydrophoben Eigenschaften der Cuticula eine effektvollere Barriere gegen die Eindringung der Sterilisationsmittel in das Gewebe darstellen.

4.2 Serologischer Nachweis von *Chaetomium globosum*

Serologische Verfahren zum Nachweis von Pilzen sind für viele Blattpathogene erfolgreich etabliert worden. Jedoch nur wenig Immunoassays sind bisher für Wurzelpathogene entwickelt worden, da Bodenbestandteile wie z.B. Huminsäuren (THORNTON & GILLIGAN 1999) oder auch andere Bodenmikroorganismen (DEWEY et al. 1997) die Assays empfindlich störten. In den hier vorliegenden Untersuchungen konnten sensitive und spezifische monoklonale Antikörper hergestellt werden, die sich für den Nachweis der Besiedlung von Gerstenwurzeln mit *C. globosum* sehr gut eignen.

Der Einsatz serologischer Verfahren diene in den hier dargestellten Untersuchungen zunächst der Untersuchung einer potentiell endophytischen Besiedlung von Gerstenpflanzen mit *C. globosum*. Hierfür wurden ELISA-Tests eingesetzt, die in gewissen Grenzen auch eine Quantifizierung des Pilzantigens ermöglichen. Mittels tissue print immunoassay (TPI) konnte

dann die Besiedlung mit *C. globosum* näher definiert und auf bestimmte Pflanzensegmente eingegrenzt werden, die dann mit Immunfluoreszenztechniken näher untersucht wurden.

Für die serologischen Untersuchungen wurden sowohl polyklonale Antikörper aus Kaninchen-Antiseren und auch monoklonale Antikörper, die in Hybridoma-Zelllinien produziert wurden, eingesetzt. Der polyklonale Antikörper zeigte eine Kreuzreaktion nicht nur mit anderen Vertretern der Gattung, sondern auch mit verschiedenen Vertretern anderer Gattungen. Auch in der Selektion von Hybridoma Zelllinien konnten keine Linien gefunden werden, die hohe Speziesspezifität aufweisen. Monoklonale Antikörper gegen Pilzantigene zeigen nur sehr selten speziesspezifische Differenzierungseigenschaften und weniger als 1 % aller Hybridoma Zelllinien sezernieren Antikörper, die mit speziesspezifischen Epitopen reagieren (DEWEY & BRASIER 1988). Speziesspezifität von monoklonalen Antikörpern gegen Pilze scheint demnach eher eine Ausnahme zu sein (MILLER 1996).

Alle aus den 3 unabhängigen Fusionsexperimenten hervorgegangenen und selektierten Antikörper zeigten eine Kreuzreaktion mit anderen Vertretern der Gattung *Chaetomium*. So wurden aus den 13 erfolgreich selektierten Hybridomen 3 Zelllinien mit sehr ähnlichen Reaktionseigenschaften ausgewählt und diese weiter getestet. Alle monoklonalen Antikörper zeigten keine Kreuzreaktionen im ELISA, jedoch wurde im IMF eine Dekoration von *Trichoderma harzianum* Hyphen und eine dadurch bedingte Fluoreszenz festgestellt. Kreuzreaktionen mit gattungsfremden Pilzarten wurden auch für monoklonale Antikörper gegen andere Pilze beschrieben und scheinen relativ häufig aufzutreten (BOSSI & DEWEY 1992, DEWEY et al. 1989, HIAT et al. 1997, KARPOVICH-TATE et al. 1998, THORNTON et al. 1997). Auf eine Verbesserung der Spezifität durch erneute Selektion wurde deshalb verzichtet, weil nicht zu erwarten war, daß eine Kreuzreaktion mit *T. harzianum* völlig verhindert werden konnte. In den Versuchen wurde deshalb sehr darauf geachtet, Kontaminationen mit *T. harzianum* zu vermeiden.

Ein quantitativer Immunoassay kann das Pilzwachstum anhand von zwei Parametern beschreiben: die Bildung der pilzlichen Biomasse oder die Anzahl koloniebildender Einheiten (DEWEY et al. 1997). Da in den hier vorliegenden Untersuchungen die Ausbreitung des Pilzes am bzw. im Pflanzengewebe untersucht werden sollte, wurde die Biomassenbildung als Parameter gewählt. Voraussetzung für die Biomassenbestimmung ist die konstitutive Bildung des Pilzantigens in allen vegetativen Wachstumsstadien des Pilzes. Dies konnte im IMF-Screening zur Bestimmung der Spezifität der monoklonalen Antikörper sowohl an jungen als auch an alten Hyphen gezeigt werden (Abb. 18). Die Gefriertrocknung zur Haltbarmachung der Pilzproteinstandards darf außerdem keinen Einfluß auf die verfügbare Menge des gelösten Antigens haben, da die darauf basierende Eichkurve dann nicht auf die Frischsubstanz des Pilzes übertragbar wäre. Eine enge Korrelation der Werte von getrockneten und frischen

Pilzantigenen konnte jedoch bestätigt werden, so daß eine Quantifizierung der Pilzmasse mittels der serologischen Verfahren erlaubt war (s. 3.2.2). Die Nachweisgrenze für das Antigen in der pilzlichen Biomasse lag bei < 1 mg Pilzfrischmasse pro g Pflanzenfrischgewicht und war damit niedrig.

KARPOVICH-TATE et al. (1998) konnten die Ausbreitung von *Cladosporium vulvum* in Tomatenblättern sowohl im GUS-Assay, wie auch im PTA-ELISA bis zu einer Nachweisgrenze von < 1 mg Pilzfrischmasse pro g Pflanzenfrischgewicht verfolgen. Dieser Nachweis war folglich ähnlich sensitiv. Der Nachweis des Antigens in der Pilztrockenmasse war jedoch etwas sensitiver, was sich bei einem Vergleich der Absorptionswerte der Standard-Eichkurve zeigt. Die Absorptionswerte waren in diesen Untersuchungen im Bereich von 1 bis $62,5 \mu\text{g}$ pro ml PBS proportional zur Konzentration des Pilzantigens. Im Vergleich dazu lag dieser Bereich in den hier vorliegenden Untersuchungen zwischen 70 und $200 \mu\text{g}$ pro ml PBS (Abb. 25). Bei Untersuchungen zum Wachstum von *Humicola lanuginosa* an Reiskörnern lag der Bereich des linearen Verlaufs der Standard-Eichkurve mit 0,5 bis $3 \mu\text{g}$ Pilztrockenmasse pro ml PBS (DEWEY et al. 1992) ebenfalls niedriger als der hier gefundene lineare Verlauf. Demgegenüber wurden jedoch in ELISA-Tests mit gefriergetrocknetem Myzelextrakten von *Rhizoctonia solani* lineare Messbereiche zwischen $125 \mu\text{g}$ und $1000 \mu\text{g}$ pro ml PBS bestimmt (THORNTON & GILLIGAN 1999), die somit oberhalb der hier dargestellten Werten lagen.

In den IMF-Untersuchungen wurde deutlich, daß die Antigen-Antikörperreaktion nur am Pilzmyzel stattfindet, während Perithezien oder Ascosporen nicht dekoriert wurden (Abb. 18 und 20). Dies konnte für die IMF-Markierung von *Trichoderma harzianum*, mit dem die monoklonalen Antikörper kreuzreagierten, bestätigt werden. Auch hier wiesen die Hyphen eine starke Fluoreszenz auf, die jedoch nicht die Chlamydosporen einschlossen (Abb. 22). Diese Differenzierung kann bei der Produktion der Antikörper genutzt werden. THORNTON et al. (1994) und THORNTON & DEWEY (1996) gelang es, sowohl monoklonale Antikörper spezifisch gegen das Myzel bzw. spezifisch gegen die Konidien von *T. harzianum* zu bilden. Die Charakterisierung der antigenen Strukturen zeigten in beiden Fällen eine spezifische Bindung der Antikörper an niedermolekulare Peptide.

In den meisten Untersuchungen jedoch reagieren die Antikörper mit höhermolekularen Glycoproteinen (DEWEY & THORNTON 1995, DEWEY et al. 1997), die anscheinend in zahlreichen Pilzgattungen ungeachtet ihrer Organisationsstufe gebildet werden. So erklären sich die häufigen und unerwünschten Kreuzreaktionen der Antikörper mit Pilzen anderer Gattungen, da die antigenen Gruppen (Epitope) des gattungsfremden Pilzes und des homologen Pilzes identisch sind.

Auch in der hier vorliegenden Arbeit sind die antigenen Strukturen wahrscheinlich höhermolekularen Glykoproteinen zuzurechnen, da der Proteinnachweis nach LOWRY et al. (1952) mit ca. 0,26 mg Protein pro ml positiv verlief und selbst ein autoklavieren des Pilzmaterials keinen Verlust der antigenen Eigenschaften bedingte. Hier sollten jedoch weitergehende Untersuchungen, z.B. eine Perjodat- und Proteasebehandlung bzw. eine chemische Deglycolisierung, die antigenen Bestandteile genauer charakterisieren.

Geringe Proteinanteile der Pilzantigene wurden auch bei Glycoproteinen aus *Humicola lanuginosa* (0,4 mg ml⁻¹, DEWEY et al. 1989), *Ophiostoma* sp., *Pseudocercospora* sp. und *Penicillium* sp. (jeweils 0,25, 0,01 und 1,5 mg ml⁻¹, MACDONALD et al. 1989), *Botrytis cinerea* (0,0007 mg ml⁻¹, BOSSI & DEWEY 1992) und *Rhizoctonia solani* (0,04 mg ml⁻¹, THORNTON et al. 1993) gefunden. DEWEY & THORNTON (1995) beobachteten, daß die wasserlöslichen Zellwandbestandteile von saprotrophen Pilzen höhere immunogene Eigenschaften und höhere Proteinmengen beinhalten, als die wasserlöslichen Bestandteile von Pathogenen. In den Voruntersuchungen zur Spezifität der polyklonalen Antiseren konnte die Beobachtung höherer Proteinmengen in den wasserlöslichen Zellwandbestandteilen von Saprophyten nicht bestätigt werden.

Bei der Immunisierung von Mäusen mit Pilzantigenen werden eine Vielzahl von Antikörperklassen gebildet, wobei Antikörper der Fraktion IgM besonders häufig auftreten. Diese haben zwar den Vorteil sehr gut zu reagieren, jedoch auch ein hohes Maß an unspezifischen Reaktionen zu bewirken (DEWEY & THORNTON 1995). In den für *Chaetomium* durchgeführten MAK-Screenings gelang es, Immunglobuline der Klasse IgG zu selektieren, die generell spezifischer und leichter zu modifizieren sind als IgM Antikörper, aber bei der Immunisierung mit wasserlöslichen Zellwandbestandteilen in nur sehr geringem Umfang von den Hybridoma-Zelllinien sezerniert werden (DEWEY et al. 1997).

4.3 Die Interaktion von *C. globosum* mit der Gerste

Die biologische Bekämpfung von Phytopathogenen durch *Chaetomium* spp. ist in zahlreichen Arbeiten beschrieben worden (s. 1.3). TVEIT & WOOD (1955) zeigten erstmals in Untersuchungen an suppressiven Böden das antagonistische Potential von *C. globosum* gegen Phytopathogene. Die Wirkungsmechanismen, die der Befallsreduktion zugrunde liegen, wurden bisher hauptsächlich in Antibiose und Nährstoff- bzw. Platzkonkurrenz gesucht. Der Pflanze als möglicher interagierender Organismus wurde dabei wenig Beachtung geschenkt.

In den hier durchgeführten histologischen Untersuchungen wurde gezeigt, daß eine Inokulation von *C. globosum* an Gerste zu einer endophytischen Besiedlung des Wurzelgewebes führen

kann. Diese Besiedlung hatte Abwehrreaktionen der Pflanze zur Folge, die sich in Verbräunungen der Wurzelzellwände und in papillenähnlichen oder hemisphärischen Zellwandauflagerungen bzw. in einer Zellwand-Autofluoreszenz sowohl in der Epidermis als auch im Cortexgewebe äußerten (Abb. 38-40). Außerdem war im Interzellularraum eine anamorphe Substanz zu finden, die als weitere Abwehrreaktion gegen die interzelluläre Ausbreitung des Pilzes gedeutet wurde (Abb. 42). Solche Abwehrreaktionen sind aus der Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen bekannt (AIST 1976, SEQUERRA et al. 1990) und wurden in neueren Untersuchungen auch bei der symptomlosen Besiedlung der Pflanzen mit Bakterien oder Pilzen beschrieben (BENHAMOU et al. 1996 und 1998, CORDIER et al. 1998, REY et al. 1998a, YEDIDA et al. 1999). Sie scheinen demzufolge nicht nur bei Pathogenbefall, sondern auch als erste Reaktion der Pflanze auf eine Besiedlung durch endophytische Mikroorganismen weit verbreitet zu sein. Je nach Kräftegleichgewicht kann sich in der darauffolgenden Interaktion eine Symbiose, wie z.B. die Arbuskuläre Mykorrhiza, oder aber auch Parasitismus einstellen. Daß *C. globosum* eine Pflanzenabwehr auslösen kann, ohne daß die Pflanze sichtbare Symptome entwickelt, ist bislang nicht bekannt. Untersucht wurde jedoch der Einfluß von *C. trilateralis* auf Spitzklee (*Trifolium pratense*, L.), wobei schwach pathogene Eigenschaften festgestellt werden konnten (PRATT & KNIGHT 1983). Außerdem konnten Bestandteile aus der Zellwand von *C. globosum* Abwehrreaktionen und Verbräunungen in Karottenzellkulturen induzieren. So führten diese sowohl hitzestabilen als auch wasserlöslichen Zellwandbestandteile zu einer erhöhten Chitinaseaktivität (KUROSAKI & NISHI 1984, KUROSAKI et al. 1986 und 1987a,b). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine Behandlung der Zellkulturen mit diesen Elicitoren zu einer erhöhten Konzentration von Salicylsäure und einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Ionenkonzentration und dadurch bedingt einer Erhöhung der extrazellulären Chitinaseaktivität führte (SCHNEIDER-MÜLLER et al. 1994).

In der Interaktion zwischen *C. globosum* und der Gerste wird das Kräftegleichgewicht offensichtlich durch äußere biotische Faktoren bedingt, die dem Pilz nur bei bestimmten optimalen Verhältnissen die Eindringung in die Pflanze ermöglichen. So benötigte *C. globosum* völlige Konkurrenzfreiheit, um das Gewebe inter- und intrazellulär zu besiedeln. Dies wurde durch die Anzucht in MS-Kultur bzw. steriler Erde gewährleistet. Bei Konkurrenzdruck durch Anwesenheit von weiteren Mikroorganismen in unsteriler Erde konnte *C. globosum* das Gewebe nur am Inokulationsort epiphytisch besiedeln (s. 3.2.3.2 und Abb. 26). Ähnliche Beobachtungen wurden in Untersuchungen zur Befallsreduktion von bodenbürtigen Pathogenen an unterschiedlichen Kulturpflanzen gemacht. Auch dort war die Besiedlung in unsteriler Erde auf den Inokulationsort beschränkt (DI PIETRO et al. 1991, HUBBARD et al. 1982, KOMMEDAHL 1981). Da *C. globosum* jedoch die Fähigkeit zur endophytischen Besiedlung der Gerstenwurzeln besitzt, kann dieser als ein Endophyt mit ausgeprägten saprophytischen Eigenschaften bezeichnet werden (s. 1.2 und 3.1). Als solcher hat er einen

Mechanismus zur Vermeidung der Bodenkonkurrenz entwickelt, indem er teilweise das Pflanzengewebe besiedelt bevor dieses seneszent wird. Bei Seneszenzeintritt fungiert er dann als Erstbesiedler und besitzt folglich einen Wettbewerbsvorteil (RODRIGUEZ und REDMAN 1997).

Die der Verbräunungsreaktion der Pflanze zugrundeliegenden Stoffe konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Die gelbe Zellwandautofluoreszenz, die vor der Verbräunung als erste Abwehrreaktion beobachtet wurde, sowie die Metachromasie des Farbstoffs Toluidinblau O deuten aber auf die Bildung phenolischer Substanzen hin (GIANINAZZI-PEARSON et al. 1996, GUTMANN 1995, JAHNEN & HAHNBROCK 1988, KOMBRINK & SOMSSICH, 1995, OLIVARES et al. 1997, RAMALINGHAM & RAVINDRANATH 1970). Die beobachtete starke Autofluoreszenz der Xylemelemente und der tertiären Endodermis (Abb. 29) bei bekannter Einlagerung von Ligninen in die Zellwände dieser Gewebe bestärkt diese Vermutung (SITTE 1991). Die Verbräunungsreaktion wird dann durch Phenoxidasen der Pflanze über eine Oxidation der Phenole zu Melaninen hervorgerufen (LIBBERT 1993). Diese bilden zusammen mit den oben beschriebenen Zellwandauflagerungen eine Abwehrstrategie der Pflanze, die einer Einschränkung der Ausbreitung des Pilzes dient. Solche Formen perivaskulärer Abwehrreaktionen sind bei der erfolgreichen Pathogenabwehr von Welkeerreger und bei der Abwehr der AMF in inkompatiblen Interaktionen (GIANINAZZI-PEARSON et al. 1996) häufig beschrieben worden. Sie dienen neben der Abwehr der Stabilisierung des Zellverbandes, wodurch ein Kollabieren der mit den Pilzen besiedelten Gewebestrukturen verhindert wird (REY et al. 1998b). So könnte auch erklärt werden, weshalb *C. globosum* trotz seiner Ausstattung mit aktiven Cellulasen bei nur sehr bedingter Fähigkeit zum Ligninabbau (SAVORY 1954, SULAIMAN & MURPHY 1994, TANAKA et al. 1992) keine fortschreitende Zerstörung des Pflanzengewebes bewirkte.

Interessant ist die Beobachtung, daß grundsätzlich keine endophytische Besiedlung der Blätter und des Scutellums auftrat. Da jedoch am Scutellum eine besonders intensive Autofluoreszenz der Zellwände festgestellt werden konnte, scheinen pflanzliche Abwehrmechanismen die endophytische Besiedlung zu verhindern. In wieweit die pilzliche Enzymausstattung für die fehlende Penetration von Bedeutung ist, ist nicht bekannt. Die beobachtete saprophytische interzelluläre Besiedlung der Blätter (s. 3.1) deutet jedoch auf eine aktive Penetration unter Beteiligung von Cutinasen hin.

Die Intensität der beobachteten Abwehrreaktionen der Wurzelzellen korrelierte mit dem Ausmaß der Besiedlung des Wurzelsystems. Dieser Zusammenhang konnte sowohl anhand der Biomassenentwicklung von *C. globosum* als auch der mikroskopischen Untersuchung des Pilzwachstums in der Pflanze aufgezeigt werden. Die variable Intensität der Abwehrreaktionen und die fehlende Wirtsspezifität deuten auf die Bildung horizontaler Virulenzfaktoren durch *C.*

globosum hin, wobei diese Faktoren in Abhängigkeit von ihrer Menge eine unterschiedlich starke Pflanzenabwehr auslösen. So kann die Bildung phytotoxischer Metabolite durch *C. globosum* in direkten Zusammenhang mit den Abwehrreaktionen gebracht werden. Eine Bildung solcher toxischen Metabolite wurde verstärkt bei pilzlichen Endophyten bzw. latenten Pathogenen gefunden, während sich Pathogene durch eine geringere Toxizität auszeichnen (SCHULZ et al. 1998). Die cytotoxischen Metabolite der Gattung *Chaetomium* (s. 1.2) könnten in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Cytotoxische Wirkungen konnten außerdem in den hier vorliegenden Untersuchungen zur Vitalität besiedelter Wurzelzellen aufgezeigt werden. Die Wurzelepidermiszellen zeigten nach Vitalitätsfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiOC₇(3) eine die Vitalität anzeigende intensive Fluoreszenz der Zellen. Bei Besiedlung dieser Zellen mit *C. globosum* war jedoch eine sehr geringe Fluoreszenz der Zellen zu erkennen (Abb. 36 und 37). *C. globosum* schien demnach die Epidermiszellen negativ zu beeinflussen, wobei dies als erster Schritt zu einer erfolgreichen intrazellulären Besiedlung des Pflanzengewebes gedeutet werden kann.

Außer Toxinen können die schon an Karottenzellkulturen beschriebenen Elicitoren aus der Zellwand von *C. globosum* die Abwehrreaktionen der Gerste ausgelöst haben (SCHNEIDER-MÜLLER et al. 1994). Die Intensität der Abwehrreaktion wäre auch hier direkt mit der Besiedlungsintensität und damit der Menge des gebildeten Elicitors zu korrelieren. Es ist außerdem bekannt, daß Elicitoren in der sehr frühen Erkennungsreaktion zwischen Wirt und Pathogen die Membranpermeabilität und damit das Membranpotential beeinflussen (WUBBEN et al. 1997). So könnte die Änderung des Membranpotentials wiederum die beobachtete Reduktion der Färbung mit DiOC₇(3) erklären. Weder eine Toxinwirkung noch eine Elicitorwirkung von *C. globosum* ist für die hier vorliegende Interaktion mit der Gerste bekannt. Im Hinblick auf die in der Antikörperproduktion eingesetzte immunogene Wirkung der Glycoproteine aus der Zelloberfläche von *C. globosum* auf Tiere, liegt eine weiterführende Untersuchung der möglichen Elicitorwirkung dieser Verbindungen auf die Gerste besonders nahe.

Bei Anzucht der Pflanzen in MS-Kultur konnten verstärkte Abwehrreaktionen gegen die Besiedlung mit *C. globosum* festgestellt werden, die zu makroskopisch sichtbaren Symptomen führten (Abb. 33). Diese Symptome werden jedoch auf die speziellen Anzuchtbedingungen, insbesondere die starke räumliche Einschränkung des Pilzes und damit verbundene Akkumulation der Toxine und/oder Elicitoren zurückgeführt. So werden Pilze, die nur unter sog. *in vitro* Bedingungen der Pflanzenanzucht Symptome an der Pflanze verursachen, als "vitropaths" bezeichnet (LEIFERT et al. 1994).

Nicht nur verstärkte Abwehrreaktionen, sondern auch ein vermindertes Pflanzenwachstum war in MS-Kultur zu beobachten. Dies kann durch die Intensivierung der Abwehrreaktionen der

Pflanze gegen *C. globosum* erklärt werden, derer es einer zusätzlichen Bereitstellung von Energie bedarf. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Erhöhung der Wurzellänge (Abb. 35), die auch von VILICH et al. (1998) an *C. globosum* und von HALLMANN (1994) an *C. funicola* gefunden werden konnte und nicht nur bei Pflanzenanzucht im MS-Medium, sondern auch bei Anzucht in steriler Erde (Abb. 34) auffällig war. Möglich wäre eine Beeinflussung des Hormonhaushalts der Pflanze, z.B. des Auxinhaushalts, durch *C. globosum* und damit eine Stimulation des Streckenwachstums als "schnelle Hormonwirkung" (LIBBERT 1993). Auxinreiche Orte sind Attraktionszentren für verschiedene Substrate, z.B. Zucker und Phosphate. So könnte außerdem ein erhöhter Auxingehalt bei vermehrtem Bedarf der Wurzeln an Zucker und anderen Stoffen neben der Pilzabwehr zusätzlich Energie verbrauchen und damit indirekt ein verringertes Sproßwachstum hervorrufen. Inwieweit *C. globosum* in der Lage ist, Auxine zu synthetisieren, ist nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß zahlreiche Bakterien und Pilze, u.a. *Fusarium*, *Phytophthora* und *Agrobakterium* Auxine produzieren können (ELSTNER et al. 1996, LIBBERT 1993).

Im unsterilen Anzuchtssystem reagierte die Pflanze auf die Pilzbesiedlung nicht eindeutig mit einer Wachstumsförderung des Wurzelsystems. In manchen Fällen konnte eine signifikante Reduktion des Wurzelwachstums festgestellt werden, in anderen war das Wachstum sowohl der Wurzeln als auch des Sprosses signifikant erhöht. Die Vielschichtigkeit der Interaktionen im unsterilen System bedingt durch die Anwesenheit zahlreicher unterschiedlicher Mikroorganismen erklärt die starken Schwankungen im Pflanzenwachstum. Zu diskutierende Einflußfaktoren sind hier: die Konkurrenz oder die Wechselwirkung mit anderen Mikroorganismen, die Verfügbarmachung von Nährsalzen (ALTOMARE et al. 1999) bzw. die Strukturverbesserung des Bodens durch die Mikroorganismen (EASH et al. 1994). So könnte eine Wachstumsförderung der Pflanze bei lokaler Besiedlung des Bodens durch *C. globosum* über eine Verfügbarmachung von Nährsalzen bzw. einer Strukturverbesserung des Bodens bewirkt werden. Eine Wachstumshemmung des Wurzelsystems ist, bedingt durch die Induktion von Abwehrmechanismen bei gleichzeitiger Hemmung des Streckungswachstums z. B. durch Ethyleneffekte vorstellbar. Die Vielschichtigkeit der Interaktionen kann in diesem Zusammenhang nur erahnt werden. Um zu einer befriedigenden Erklärung für die fehlende Reproduzierbarkeit im unsterilen Anzuchtssystem zu kommen, müßten die mikrobiellen Prozesse, die das Pflanzenwachstum beeinflussen könnten, detailliert untersucht werden.

Bei Pflanzenanzucht in steriler Erde waren die beschriebenen Abwehrreaktionen im Verhältnis zur Anzucht in MS-Kultur stark abgeschwächt und deshalb nur auf mikroskopischer Ebene zu finden (Abb. 40). Neben den oben diskutierten Toxinen und/oder Elicitoren wird auch die wesentlich geringere Besiedlung der Pflanze mit *C. globosum* in steriler Erde einer der Gründe für die schwächeren Abwehrreaktionen der Pflanze sein. Ein wesentlich geringeres Nährstoffangebot wie auch ein vermindertes Wasserpotential der Erde im Vergleich zum MS-

Medium könnte die Ursache für die reduzierte Besiedlung sein. Ein weiterer Grund für das reduzierte Pilzwachstum könnte in cytotoxischen Eigenschaften der sterilisierten Erde gesucht werden. So ist zumindest ein negativer Einfluß einer Sterilisationsbehandlung der Anzuchtserde auf das Pflanzenwachstum bekannt (WOLF et al. 1989). Ein gleichzeitiger Einfluß auf das Pilzwachstum ist daher nicht auszuschließen. Weiterhin unterliegt das Wachstum von *C. globosum* in der Erde verglichen mit dem Wachstum im MS-Medium dem Einfluß einer wiederholten Wässerung, was zu einer Verdünnung der cytotoxischen Metabolite und/oder der Elicitoren und dadurch zu einer verringerten Wirksamkeit führen kann.

Da keine makroskopisch sichtbaren Symptome bei Pflanzenanzucht in steriler Erde zu finden waren, ist das Wachstum von *C. globosum in planta* in diesem Anzuchtssystem eindeutig als endophytisch zu bezeichnen. Endophyten können nach RODRIGUEZ & REDMAN (1997) abhängig von der Art ihres Wachstums in der Pflanze in vier Gruppen eingeteilt werden: 1. Pilze die aktiv und umfangreich das Pflanzengewebe besiedeln, 2. Pilze die aktiv aber sehr lokal das Pflanzengewebe besiedeln, 3. Pilze die sehr rasch durch pflanzliche Abwehrreaktionen in ihrem Wachstum eingegrenzt werden und in einem Ruhestadium verbleiben bis die Pflanze seneszent wird, 4. Pilze die rasch durch pflanzliche Abwehrmechanismen abgeschirmt werden, aber metabolisch aktiv bleiben.

Vorstellbar wäre eine Zuordnung von *C. globosum* in die Gruppe (3), da die ein- bis zweiwöchige Besiedlungsphase durch eine Perithezienbildung abgeschlossen wurde und damit der Pilz in eine metabolisch inaktive Phase überging. Ein Szenario, in dem *C. globosum* die Pflanze im jungen Stadium besiedelt und dann bis zur Seneszenz in einem Ruhestadium dort verbleibt, wäre nach den hier vorliegenden Untersuchungen möglich.

4.4 Die Mechanismen der Befallsminderung

Aus Voruntersuchungen war der befallsreduzierende Einfluß von *C. globosum* auf *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* bekannt (VILICH 1995, VILICH et al. 1998). In diesen Untersuchungen wurde das Saatgut mit einer Ascosporensuspension von *C. globosum* behandelt und nach einer zweiwöchigen Anzuchtsphase in einem Felderde-Sand Gemisch die Oberseite der Primärblätter mit *E. graminis* inokuliert. Es ergab sich eine reduzierte Pustelanzahl pro Blatt von bis zu 48 %. Die hier vorliegenden Untersuchungen konnten den befallsreduzierenden Einfluß einer *C. globosum* Behandlung der Wurzeln auf *E. graminis* bestätigen. Die Befallsreduktionen lagen jedoch meist zwischen 15 und 25 %. Die Variabilität im Wirkungsgrad eines biologischen Agens ist ein weit verbreitetes Phänomen und beruht auf der Zusammenwirkung dreier voneinander anhängiger Organismen (WELLER 1988) und deren jahreszeitlichen Rhythmen (VILICH et al. 1998).

Neben der Untersuchung der Interaktion Pflanze - *C. globosum* war ein weiteres Ziel der hier vorliegenden Arbeit die Mechanismen der beobachteten Befallsreduktion zu untersuchen. Bedingt durch die fehlende Reproduzierbarkeit bei Anzucht der Pflanzen in unsteriler Felderde bzw. das stark unterdrückte Pflanzenwachstum bei Anzucht in steriler Erde wurden diese Untersuchungen ausschließlich an Pflanzen in MS-Kultur durchgeführt. Wenig einheitliche Versuchsbedingungen, wie z.B. eine variierende Zusammensetzung der Anzuchtserde und eine variierende Mikroorganismenflora werden zusammen mit der Konkurrenzschwäche von *C. globosum* (s. 4.3) für die fehlende Reproduzierbarkeit verantwortlich sein. Von besonderer Bedeutung war in diesem Zusammenhang die Wiederbesiedlung des sterilisierten Substrats mit Mikroorganismen. Viele Pilze fungieren als Erstbesiedler und werden z.B. durch die Gattungen *Cladosporium*, *Penicillium* und *Trichoderma* repräsentiert (DOMSCH et al. 1993). Insbesondere *Trichoderma* spp. wurde in den Versuchen regelmäßig aus der Erde isoliert. Viele erstbesiedelnde Pilze besitzen ebenfalls ein antagonistisches Potential und können somit die Wirksamkeit einer *Chaetomium* Behandlung relativieren. Für *Trichoderma harzianum* z.B. ist eine befallsmindernde Wirkung auf *E. graminis* nach einer Bodenapplikation erst kürzlich beobachtet worden (ELAD et al. 1999). Unter diesem Gesichtspunkt war für die weiterführenden Untersuchungen der Wirkungsmechanismen der Einsatz eines axenischen Pflanzenanzuchtssystems mittels hydroponischer bzw. fester Kultur, z.B. MS-Agar, dem Einsatz von Felderde vorzuziehen.

C. globosum besiedelte ausschließlich die Wurzeln der Gerste bzw. die bodennahen Bereiche der Coleoptile und der Blattscheiden (Abb. 26 und 27). Direkte Wirkungsmechanismen wie Mykoparasitismus oder Platzkonkurrenz können deshalb für die Reduktion des Befalls mit dem Blattpathogen *E. graminis* f. sp. *hordei* ausgeschlossen werden. Eine Nährstoffkonkurrenz, z.B. über eine veränderte Stickstoffverfügbarkeit bedingt durch das Wachstum des Pilzes in der Wurzel, scheint ebenfalls fraglich, da ein verändertes Stickstoffangebot bei Befall der Gerste mit *E. graminis* in einer Minderung der Penetration des Epidermisgewebes durch das Pathogen und der Sporulation des Pathogens resultiert (OERKE et al. 1989, BAINBRIDGE 1974). Beides konnte jedoch in den vorliegenden Untersuchungen ausgeschlossen werden (Tab. 4 und 5). Hypersensitive Reaktionen bzw. eine erhöhte Autofluoreszenz der Zellwände der mit *E. graminis* befallenen Blattepidermen wurden ebenfalls nicht beobachtet (Tab. 5). Derartige Veränderungen waren insbesondere im Hinblick auf die gefundenen verstärkten Abwehrreaktionen in den Wurzeln vermutet worden. Die beobachtete erhöhte Autofluoreszenz wurde dabei als ein Hinweis auf eine verstärkte Einlagerung von phenolischen Verbindungen in die Zellwand der Wurzeln als Reaktion auf die Besiedlung durch *C. globosum* gewertet (CARVER et al. 1991).

Die Besiedlung der Gerstenwurzeln durch *C. globosum* resultierte auf den Primärblättern in einer verringerten Dichte der 41 h nach der Inokulation mit *E. graminis* auf dem Blatt

vorgefundenen Konidien. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die Befallsreduktion durch eine verringerte Konidienanhaftung an die Blätter hervorgerufen wurde. Der verringerten Konidienanhaftung muß somit ein unbekannter Wirkungsmechanismus zugrunde liegen, der den Verlust der Konidienvitalität und damit der Konidienanhaftung in einem sehr frühen Stadium der Infektion bewirkte. Während der 41-stündigen Inkubation, der Entnahme der Blätter oder durch die Vernetzungseigenschaften der Fixierungsmittel Ethanol und Eisessig während der Aufarbeitung der Proben können die abgetöteten Konidien abgelöst worden sein (STEINER, pers. Mitt.).

Die Anhaftung der Mehltaukonidien an die Primärblätter könnte durch Wirkungsmechanismen beeinflußt werden, die den ersten Kontakt der Konidien zu den Wirtszellen stören und dadurch den sehr frühen Infektionsprozeß beeinträchtigen. Insbesondere dem Primärkeimschlauch des Konidiums kommt eine wichtige Funktion während des Infektionsprozesses zu. Er dient z.B. der Verankerung im Wirtsgewebe, der Wasseraufnahme bei geringer Luftfeuchtigkeit und der Nährstoffaufnahme (CARVER & BUSHNELL 1983, CARVER & INGERSSEN 1987). Eine Störung dieses frühen Infektionsstadiums kann zu einem Verlust der Konidienvitalität führen. Diese Konidien können dann bei der Entnahme oder Aufbereitung der Proben verloren gehen. Mögliche Faktoren, die den ersten Kontakt des Primärkeimschlauchs zur Epidermis beeinflussen, sind in cuticulären Wachsstrukturen, der Cuticuladicke und dem Silicium-Anteil der Zellwände zu suchen (CARVER & BUSHNELL 1983). Derartige pflanzliche Abwehrreaktionen, die durch systemische Resistenz, 'systemic acquired resistance' (SAR), ausgelöst werden, können außerdem mit der Induktion von 'pathogenesis-related proteins', PR-Proteinen, oder durch Akkumulation von Salicylsäure, antimikrobiellen Phytoalexinen und strukturellen Abwehrbarrieren wie Lignin, Kallose, oder hydroxyprolinreichen Zellwandproteinen, die Pathogenentwicklung einschränken (KUC 1997, FRYE & INNES 1998). So könnte eine systemische Resistenz z.B. durch Elicitoren aus der Zellwand von *C. globosum* induziert werden, die durch einen Anstieg des Salicylsäuregehalts gemäß den Untersuchungen von SCHNEIDER-MÜLLER et al. (1994) charakterisiert ist. Bekannt ist, daß eine Salicylsäure-Behandlung von Erbsenblättern eine Befallsreduktion mit Echtem Mehltau in einer Größenordnung von 20-30 % (FREY & CARVER 1998) und eine Behandlung von Gerstenblättern eine Befallsreduktion mit Echtem Mehltau von >80 % durch SAR bewirken kann (WALTERS et al. 1993). Da angenommen wird, daß Salicylsäure nicht als primäres Signal einer SAR in der Pflanze fungiert (RASMUSSEN et al. 1991, WILLITS & RYALS 1998), muß ein weiteres Signal postuliert werden, welches in der Pflanze transloziert wird und in der Epidermis die Resistenz induziert. In dem hier vorliegenden System kann eine Störung des Kontaktes des Primärkeimschlauchs mit der Wirtszelle, z.B. über eine Induktion der Chitinase, die Befallsreduktion ausgelöst haben. Es sei ergänzend hinzugefügt, daß solche Steigerungen der Enzymaktivitäten oft mit der Resistenzinduktion in Dicotyledonen korreliert,

jedoch in Monocotyledonen bislang nicht eindeutig aufgezeigt werden konnte (STEINER & SCHÖNBECK 1995).

Neben SAR können grundsätzlich noch antagonistische Effekte, wie z.B. die Translokation von Antibiotika, für die Befallsreduktion in Frage kommen. Solche Antibiotika oder Toxine können von *C. globosum* gebildet und über den Transpirationsstrom zum ihrem Wirkungsort gebracht werden (NATORI 1986, s. auch 1.2). Erste Hinweise, die für einen solchen Wirkungsmechanismus sprechen, lieferten *in vitro* Untersuchungen zur Hemmung der *E. graminis* Konidienkeimung durch Kulturfiltrate von *C. globosum* (VILICH et al. 1998). Die Reduktion der Konidienkeimung betrug in diesen Experimenten 30 %. Demzufolge ist auch eine direkte Wirkung von *C. globosum* auf *E. graminis* über eine Metabolitentranslokation in der Pflanze nicht gänzlich auszuschließen.

5 Zusammenfassung

Der Ascomycet *Chaetomium globosum* konnte systemisch den Befall der Gerste mit dem Echten Gerstenmehltau *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* vermindern. Um die der Befallsreduktion zugrundeliegenden Interaktionen zwischen *Chaetomium globosum*, der Pflanze und dem Echten Mehltau auf den Primärblättern aufzuklären, wurden Untersuchungen zu folgenden Themengebieten durchgeführt:

1) Interaktion Gerste - *Chaetomium globosum*

Serologie

Zum spezifischen Nachweis des Pilzes in der Pflanze wurden sowohl polyklonale Antikörper aus Kaninchen-Antiseren als auch monoklonale Antikörper der Klasse IgG gegen Oberflächenstrukturen von *C. globosum* Hyphen getestet. Die polyklonalen Antikörper zeigten Kreuzreaktionen mit zahlreichen Vertretern verschiedener Pilzgattungen, mit Pflanzenkonstituenten und mit verschiedenen Arten der Gattung *Chaetomium*. Die eingesetzten monoklonalen Antikörper dreier selektierter Hybridoma-Zelllinien waren gattungsspezifisch und zeigten keine Kreuzreaktion mit Pflanzenkonstituenten. Die Antikörper der Zelllinie 1-2C12-A7-E6 wiesen das Pilzantigen bis zu einer Nachweisgrenze von 165 µg Pilzfrischgewicht bzw. 3 µg Pilzprotein pro ml nach.

Endophytisches Wachstum: Histologie

C. globosum besiedelte das Wurzelgewebe der Gerste in Murashige und Skoog (MS) - Kultur inter- und intrazellulär. Die Hyphen drangen von der Rhizosphäre aus in die Epidermis ein und wuchsen dann bis in das Cortexgewebe. Eine Besiedlung der Endodermis und des Zentralzylinders wurde nie beobachtet. In steriler Erde besiedelte *C. globosum* die Wurzelepidermis und die äußeren Cortexschichten endophytisch, drang jedoch nicht in tiefere Gewebeschichten ein. Das Scutellum und der proximale Bereich der Blattscheiden wurden in beiden Anzuchtssystemen epiphytisch besiedelt. Eine Besiedlung der Blattspreiten wurde dagegen nie beobachtet.

Endophytisches Wachstum: Oberflächensterilisation

Das Wachstum von *C. globosum in planta* in MS-Kultur wurde anhand einer Oberflächensterilisation der Wurzeln mit Peressigsäure und Ethanol nachgewiesen. In Reisolationsversuchen von *C. globosum* aus diesen Wurzelsegmenten zeigten 20 % der Segmente eine Besiedlung. Da die Sterilisationsmittel bis in die Epidermis eindringen und die dort gelegenen Hyphen abtöten konnte eine Besiedlung in steriler Erde dagegen mit diesem

Test nicht nachgewiesen werden. Eine üblicherweise verwendete Oberflächensterilisation mit Natriumhypochlorid und Ethanol war nicht ausreichend, da bei Verwendung von bis zu 9 % NaOCl die Ascosporen von *C. globosum* auf der Oberfläche des Gewebes nicht abgetötet wurden.

Etablierung der Interaktion

C. globosum besiedelte die Gerstenwurzeln offensichtlich nur bei Ausschluß konkurrierender Mikroorganismen endophytisch. Bei mikrobieller Konkurrenz verblieb *C. globosum* am Inokulationsort und besiedelte das Scutellum epiphytisch.

Bei Ausschluß mikrobieller Konkurrenz wurde in der frühen Phase der Wurzelbesiedlung ein Vitalitätsverlust der Epidermiszellen beobachtet. Dies läßt auf eine Erkennungsreaktion zwischen Pilz und Pflanze schließen, die bei fortschreitender Besiedlung der Wurzelzellen durch *C. globosum* zu einem Absterben dieser Zellen führte.

Induktion von Abwehrreaktionen

Die epiphytische und endophytische Besiedlung durch *C. globosum* war von Abwehrreaktionen der Pflanze begleitet, die sich in Zellwandverbräunungen, hemisphärischen und papillenähnlichen Zellwandauflagerungen und einer Autofluoreszenz bei Blaulichtanregung der unmittelbar an die Hyphen angrenzenden Wirtszellwände äußerte. Zusätzlich war die Bildung einer anamorphen Substanz im Interzellularraum zu beobachten, die die interzelluläre Ausbreitung des Pilzes einzuschränken schien. Eine besonders starke Autofluoreszenz, welche auf die Einlagerung phenolischer Substanzen in die Zellwände hindeutete, war in den Epidermiszellwänden der epiphytisch besiedelten Scutellen zu beobachten.

Pflanzenwachstum

Bei inter- und intrazellulärer Besiedlung der Wurzeln durch *C. globosum* war das Sproßwachstum der Gerste reduziert. Das Wurzellängenwachstum wurde dagegen durch die Besiedlung mit *C. globosum* signifikant gefördert, wobei gleichzeitig der Wurzeldurchmesser abnahm. Außerdem war dann das Wurzelfrischgewicht erhöht.

2) Interaktion *Chaetomium globosum* - Gerste - *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*

Da niemals eine Besiedlung der Blattspreiten durch *C. globosum* beobachtet wurde, können die Mechanismen der Befallsreduktion von *E. graminis* f. sp. *hordei* deshalb weder auf Platzkonkurrenz noch auf Hyperparasitismus beruhen.

Pflanzenanzuchtsbedingungen

In MS-Kultur wurde eine reproduzierbare Resistenzerhöhung der Pflanzen durch *C. globosum* gegenüber *E. graminis* f. sp. *hordei* erreicht, die eine Erarbeitung der Wirkungsmechanismen ermöglichte. Die beobachteten Wirkungsgrade lagen zwischen 15 und 25 %.

Befallsverlauf

Eine erfolgreiche Pathogenabwehr konnte weder auf eine reduzierte Appressorienbildung noch auf eine gestörte Haustorienbildung des obligat biotrophen Parasits zurückgeführt werden. Auch die Reproduktion von *E. graminis* f. sp. *hordei* war nach seiner Etablierung in der Epidermis unbeeinflusst. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion der Konidienanhaftung an die Blattoberfläche, die sich in einer verringerten Konidiendichte äußerte. Vermutet wird deshalb ein induziertes und systemisch transloziertes Signal, das die Konidienkeimung und damit die Anhaftung von *E. graminis* f. sp. *hordei* an die Blattoberfläche verringert.

6 Anhang

Liste der im Text verwendeten Abkürzungen

A. demin	demineralisiertes Wasser
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
DABCO	1,4-Diazobicyclo-(2.2.2)-Octan
DiOC ₇ (3)	3,3-Diheptyloxacarbocyanin-jodid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IMF	Immunfluoreszenz
lx	Lux
M	Molarität
MAK	monoklonale Antikörper
MEA	Malzextrakt Agar
MS-Kultur	Murashige und Skoog - Kultur
µm	Mikrometer
NaOCl	Natriumhypochlorid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
PAK	polyklonale Antikörper
PBS	Phosphatpuffer, Phosphate Buffered Saline
PBST	PBS plus 0,05 % Tween 20
PDA	Kartoffel Dextrose Agar
PTA-ELISA	Plate trapped antigen - ELISA
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RAM-IgG-aP	mit alkalischer Phosphatase gekoppelte sekundäre Antikörper, die in Kaninchen gegen Mäuse hergestellt wurden
RAM-IgG-FITC	mit FITC gekoppelte sekundäre Antikörper, die in Kaninchen gegen Mäuse hergestellt wurden
RAM-IgG (H+L)	sekundäre Antikörper, Gesamtmolekül aus leichten (L ight) und schweren (H eavy) Polypeptidketten
SEM	Standard error of mean; Standardfehler des Mittelwerts
TPI	Tissue print immunoblot

7 Literaturliste

AGARWAL, P.N., VERMA, G.M., VERMA, R. K.& SAHAL, D.D. (1963). Decomposition of cellulose by the fungus *Chaetomium globosum*. (1) Studies on enzyme activity. Indian Journal of Experimental Biology **1**, 46-50.

AIST, J.R. (1976). Papillae and related wound plugs of plant cells. Annual Review of Phytopathology **14**, 145-175.

ALABOUVETTE, C., LEMANCEAU, P. & STEINBERG, C. (1996). Biological control of *Fusarium* wilts: opportunities for developing a commercial product. In *Managing Soilborne Plant Pathogens* (ed. R. Hall). APS Press, St. Paul, Minnesota. S. 192-212.

ALTOMARE, C., NORVELL, W.A., BJÖRCKMAN, T. & HARMAN, G.E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Applied and Environmental Microbiology **65**, 2926-2933.

ANDREWS, J.H., BERBEE, F.M. & NORDHEIM, E.F. (1983). Microbial antagonism to the imperfect stage of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. Phytopathology **73**, 228-234.

ANKE, T., OBERWINKLER, F., STEGLICH, W. & SCHRAMM, G. (1977). The strobilurins - new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Srobilurus tenacellus*. Journal of Antibiotics **30**, 806-810.

ANONYM (1999). *Beschreibende Sortenliste*. Getreide, Mais, Ölf Früchte, Leguminosen, Hackfrüchte. Hrsg. Bundessortenamt, Landbuch Verlag, Hannover, 158 S.

ARX, J.A. VON, GUARRO, J. & FIGUERAS, M.J. (1986). The ascomycete genus *Chaetomium*. Nova Hedwigia, Beiheft 84, J. Cramer, Berlin, Stuttgart, 162 S.

BACON, C.W. (1995). Toxic endophyte-infected tall fescue and range grasses. Historic perspectives. Journal of Animal Science **73**, 861-870.

BACON, C.W. & DeBATTISTA, J. (1991). Endophytic fungi of grasses. In *Handbook of Applied Biology. Vol.1: Soil and Plants* (ed. D.K. Arora, B. Rai, K.G. Mukerji, G.R. Knudsen). Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, S. 231-256.

BARCLAY, S.L. & SMITH, A.M. (1986). Rapid isolation of monoclonal antibodies specific for cell surface differentiation antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **83**, 4336-4340.

BECKER, F.A., HILBERT, M., KNOPF, H.E., VOLLMER, F.-J. & WETZEL, M. (1986). Halm- und Kornerfrüchte. In *Pflanzenproduktion* (ed. J. Oehmichen). Verlag Paul Parey, Berlin, S. 218-375.

BECKMANN, K.B., HARRISON, J.G. & INGRAM, D.S. (1994). Optimization of a polyclonal enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of fungal biomass for use in studies of plant defence responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **44**, 19-32.

BELLO, T.M., WINTER, S., FADINA, O.O., SCHILDER, A.M.C. & THOTTAPPILLY, G. (1996). Development and evaluation of a serological assay for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in seeds of cowpea, *Vigna unguiculata*, L. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem*, **321**, 640.

BENHAMOU, N., KLOEPPER, J.W., QUADT-HALLMANN, A. & TUZUN, S. (1996). Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology* **112**, 919-929.

BENHAMOU, N., KLOEPPER, J.W., TUZUN, S. (1998). Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* **204**, 153-168.

BERMINGHAM, S., DEWEY, F.M. & MALTBY, L. (1995). Development of a monoclonal antibody-based immunoassay for the detection and quantification of *Anguillospora longissima* colonizing leaf material. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2606-2613.

BETTUCHI, L. & SARAVAY, M. (1993). Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: a preliminary study. *Mycological Research* **97**, 679-682.

BIANCO, L.J., RICHARDSON, G.H., SHERBON, J.W., BURKE, J.A., ROTH, W., BIGGS, D.A., GINN, R. & LIDEN, D. (1978). Chemical methods. In *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (ed. E.H. Marth). American Public Health Association, Washington, S. 235-236.

- BILLS, G.F. (1996). Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants. Systematics, Ecology and Evolution* (ed. S.C. Redlin und L.M. Carris). APS press, The American Phytopathological Society, St. Paul, S. 31-65.
- BLAKE, M.S., JOHNSTON, K.H., RUSSEL-JONES, G.J. & GOTSCHLICH, E.C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated antibody on western blots. *Analytical Biochemistry* **136**, 175-179.
- BOSSI, R. & DEWEY, F.M. (1992). Development of a monoclonal antibody-based immunodetection assay for *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* **41**, 472-482.
- BOUDREAU, M.A. & ANDREWS, J.H. (1987). Factors influencing antagonism of *Chaetomium globosum* to *Venturia inaequalis*: A case study of failed biocontrol. *Phytopathology* **77**, 1470-1475.
- BRADFORD, M. M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.
- BREWER, D. & TAYLOR, A. (1978). The production of toxic metabolites by *Chaetomium* spp. isolated from soils of permanent pasture. *Canadian Journal of Microbiology* **24**, 1082-1086.
- BREWER, D., HANNAH, D.E. & TAYLOR, A. (1966). The biological properties of 3,6-epidithiadiketopiperazines. Inhibition of growth of *Bacillus subtilis* by gliotoxins, sporidesmins, and chetomin. *Canadian Journal of Microbiology* **12**, 1187-1195.
- BREWER, D., DUNCAN, J.M., JERRAM, W.A., LEACH, C.K., SAFE, S., TAYLOR, A., VINIG, L.C., ARCHIBALD, R. McG., STEVENSON, R.G., MIROCHA, C.J. & CHRISTENSEN, C.M. (1972). Ovine ill-thrift in Nova Scotia. 5. The production and toxicology of chetomin, a metabolite of *Chaetomium* spp. *Canadian Journal of Microbiology* **18**, 1129-1137.
- BURROWS, B.F. (1967). A new fungal tetrahydrofuran. *Chemical Communications* **12**, 597-598.

- CARROLL, G.C. (1986). The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In *Microbiology of the Phyllosphere* (ed. N.J. Fokkema und J. van den Heuvel). Cambridge University Press, Cambridge, UK, S. 205-222.
- CARROLL, G.C. (1990). Fungal endophytes in vascular plants: mycological research opportunities in Japan. *Transactions of the Mycological Society Japan* **31**, 103-116.
- CARROLL, G.C. (1992). Fungal mutualism. In *The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem* (ed. G.C. Carroll und D.T. Wicklow). Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, S. 327-354.
- CARVER, T.L.W. (1987). Influence on host epidermal cell type, leaf age and position, on early stages of mildew colony development on susceptible and resistant oats. *Transactions of the British Mycological Society* **89**, 315-320.
- CARVER, T.L.W. & BUSHNELL, W.R. (1983). The probable role of primary germ tubes in water uptake before infection by *Erysiphe graminis*. *Physiological Plant Pathology* **23**, 229-240.
- CARVER, T.L.W. & INGERSSON, S.M. (1987). Responses of *Erysiphe graminis* germings to contact with artificial and host surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **30**, 359-372.
- CARVER, T.L.W. & INGERSSON-MORRIS, S.M. (1989). Effects of inoculum density on germling development by *Erysiphe graminis* f. sp. *avenae* in relation to induced resistance of oat cells to appressorial penetration. *Mycological Research* **92**, 18-24.
- CARVER, T.L.W., ROBBINS, M.P. & ZEYEN, R.J. (1991). Effects of two PAL inhibitors in the susceptibility and localized autofluorescent responses of oat leaves attacked by *Erysiphe graminis* DC. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**, 269-287.
- CHANG, I. & KOMMEDAHL, T. (1968). Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathology* **58**, 1359-1401.
- CHAPMAN, E.S. & FERGUS, C.L. (1975). Germination of ascospores of *Chaetomium globosum*. *Mycologia* **67**, 1048-1052.
- CHRISTENSEN, M.J. (1996). Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloë* endophytes. *Australasian Plant Pathology* **25**, 186-191.

CHRISTENSEN, C.M., NELSON, G.H., MIROCHA, C.J., BATES, F. & DORWORTH, C.E. (1966). Toxicity to rats of corn invaded by *Chaetomium globosum*. *Applied Microbiology* **14**, 774-777.

CLAY, K. (1997). Fungal Endophytes, herbivores and the structure of grassland communities. In *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems* (ed. A.C. Gange und V.K. Brown). Blackwell Science Ltd, Cambridge University Press, UK, S. 151-169.

CORDIER, C., POZO, M.J., BAREA, J.M., GIANINAZZI, S. & GIANINAZZI-PEARSON, V. (1998). Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 1017-1028.

CORRELL, J.C., KLITTICH, C.J.R. & LESLIE, J.F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* **77**, 1640-1646.

CROUS, P.W., PETRINI, O., MARAIS, G.F., PRETORIUS, Z.A. & REHDER, F. (1995). Occurrence of fungal endophytes in cultivars of *Triticum aestivum* in South Africa. *Mycoscience* **36**, 105-111.

CULLEN, D., BERBEE, F.M. & ANDREWS, J.H. (1984). *Chaetomium globosum* antagonizes the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis* under field conditions. *Canadian Journal of Botany* **62**, 1814-1818.

CULLEN, D. & ADREWS, J.H. (1984). Evidence for the role of antibiosis in the antagonism of *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Canadian Journal of Botany* **62**, 1819-1823.

DAVIS, R.F., BACKMAN, P.A., RODRIGUEZ-KABANA, R. & KOKAILS-BURELLE, N. (1992). Biological control of apple fruit diseases by *Chaetomium globosum* formulations containig cellulose. *Biological control* **2**, 118-123.

DAY, A.W. & GARDINER, R.B. (1987). Fungal fimbriae. *Studies in Mycology* **30**, 333-349.

DEWEY, F.M. & BRASIER, C.M. (1988). Development of ELISA for *Ophiostoma ulmi* using antigen-coated wells. *Plant Pathology* **37**, 28-35.

DEWEY, F.M. & THORNTON, C.R. (1995). Fungal immunodiagnostics in plant agriculture. In *New Diagnostics in Crop Sciences* (eds. J. Skeritt und R. Appels). Biotechnology in Agriculture No. 13. CAB International, Wallingford, S. 151-170.

DEWEY, F.M., MACDONALD, M.M. & PHILLIPS, S.I. (1989). Development of a monoclonal antibody-ELISA, Dot Blot, and Dipstick immunoassay for *Humicola lanuginosa* in rice. *Journal of General Microbiology* **135**, 361-374.

DEWEY, F.M., TWIDDY, D.R., PHILLIPS, S.I., GROSE, M.J. & WAREING, P.W. (1992). Development of a quantitative monoclonal antibody-based immunoassay for *Humicola lanuginosa* on rice grains and comparison with conventional assays. *Food and Agricultural Immunology* **4**, 153-167.

DEWEY, F.M., THORNTON, C.R. & GILLIGAN, C.A. (1997). Use of monoclonal antibodies to detect, quantify and visualize fungi in soils. *Advances in Botanical Research* **24**, 275-308.

DI PIETRO, A., KÜNG, R., GUT-RELLA, M. & SCHWINN, F.J. (1991). Parameters influencing the efficacy of *Chaetomium globosum* in controlling *Pythium ultimum* damping-off of sugar beet. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **98**, 565-573.

DI PIETRO, A., GUT-RELLA, M., PACHLATKO, J.P. & SCHWINN, F.J. (1992). Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. *Phytopathology* **82**, 131-135.

DOMSCH, K.H., GAMS, W. & ANDERSON, T.-H. (1993). *Compendium of Soil Fungi, Vol. 1*. IHW-Verlag, Eching, 859 S.

DUCKETT, J.G. & READ, D.J. (1991). The use of the fluorescent dye, 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide, for selective staining of ascomycete fungi associated with liverwort rhizoids and ericoid mycorrhizal roots. *New Phytologist* **118**, 259-272.

EASH, N.S., KARLEN, D.L. & PARKIN, T.B. (1994). Fungal contributions to soil aggregation and soil quality. In *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment* (ed. J.W. Doran, D.C. Coleman, D.F. Bezdicsek, B.A. Stewart). Proceedings of a symposium, Soil Science Society of America Inc., Minneapolis, S. 221-228.

ELAD, Y., KÖHL, J. & FOKKEMA, N.J. (1994). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* **100**, 315-336.

ELAD, Y., RAV DAVID, D., LEVI, T., KAPAT, A., KIRSHNER, B., GUVIRIN, E. & LEVINE, E. (1999). *Trichoderma harzianum* T 39 - mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds II* (ed. H. Lyr, P.E. Russell, H.W. Dehne, H.D. Sisler). 12th International Rheinhardtbrunn Symposium, Friedrichroda, 24th-29th May 1998. Intercept LTD, Andover, UK, S. 459-467.

ELSTNER, E.F., OßWALD, W. & SCHNEIDER, I. (1996). *Phytopathologie. Allgemeine und biochemische Grundlagen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 328 S.

ESSELN, S. & WELTZIEN, H.-C. (1997). Xylembesiedlung von Rebenstecklingen durch endophytische Pilze in verschiedenen Kultursubstraten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **104**, 346-352.

FISHER, P.J., ANSON, A.E. & PETRINI, O. (1986). Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. *Transactions of the British Mycological Society* **86**, 153-193.

FISHER, P.J., PETRINI, O. & WEBSTER, J. (1991). Aquatic hyphomycetes and other fungi in living aquatic and terrestrial roots on *Alnus glutinosa*. *Mycological Research* **95**, 543-547.

FISHER, P.J., PETRINI, O. & LAPPIN SCOTT, H.M. (1992). The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays*, L.). *New Phytologist* **122**, 299-305.

FLOR, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275-296.

FREEMAN, S. & RODRIGUEZ, R.J. (1993). Genetic conversion of a fungal pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* **260**, 75-78.

FREIALDENHOVEN, A., PETERHÄNSEL, C., KURTH, J., KREUZALER, F. & SCHULTE-LEFERT, P. (1996). Identification of genes required for the function of non-race specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. *The Plant Cell* **8**, 5-14.

FREY, S. & CARVER, T.L.W. (1998). Induction of systemic resistance in pea to pea powdery mildew by exogenous application of salicylic acid. *Journal of Phytopathology* **146**, 239-245.

FRYE, C.A., & INNES, R.W. (1998). An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *The Plant Cell* **10**, 947-956.

GAHAN, P.B. (1984). *Plant histochemistry and cytochemistry*. Academic Press, New York, 301 S.

GERLACH, D. (1984). *Botanische Mikrotechnik*. Thieme Verlag, Stuttgart, 311 S.

GIANINAZZI-PEARSON, V., DUMAS-GAUDOT, E., GOLLOTTE, A., TAHIRI-ALAOUI, A. & GIANINAZZI, S. (1996). Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **133**, 45-57.

GUTMANN, M. (1995). Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semithin sections of plant tissue. *Journal of Microscopy* **179**, 277-281.

HALLMANN, J. (1994). Einfluß und Bedeutung endophytischer Pilze für die biologische Bekämpfung des Wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita* an Tomate. Dissertation, Universität Bonn.

HALLMANN, J. & SIKORA, R.A. (1994). Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte, on *Meloidogyne incognita* infection of tomato. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **101**, 475-481.

HALLMANN, J., KLOPPER, J.W. & RODRIGUEZ-KABANA, R. (1997). Application of the Scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. *Canadian Journal of Microbiology* **43**, 411-416.

HALMSCHLAGER, E., BUTIN, H. & DONAUBAUER, E. (1993). Endophytische Pilze in Blättern und Zweigen von *Quercus petraea*. *European Journal of Forest Pathology* **23**, 51-63.

HARLOW, E. & LANE, D. (1988). *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 726 S.

HARMAN, G.E., ECKENRODE, C.J. & WEBB, D.R. (1978). Alteration of spermosphere ecosystems affecting oviposition by the bean seed fly and attack by soilborne fungi on germinating seeds. *Annals of Applied Biology* **90**, 1-6.

- HARRISON, J.G., BARKER, H., LOWE, R. & REES, E.A. (1990). Estimation of amounts of *Phytophthora infestans* mycelium in leaf tissue by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Pathology* **39**, 274-277.
- HAWKSWORTH, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C. & PEGLER, D.N. (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. CAB International, Wallingford, 616 S.
- HIATT, E.E., HILL, N.S., BOUTON, J.H. & MIMS, C.W. (1997). Monoclonal antibodies for detection of *Neotyphodium coenophialum*. *Crop Science* **37**, 1265-1269.
- HINTON, M.J. & PARRY, D.W. (1993). Screening selected fungi for antagonism towards *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, the cause of eyespot disease of cereals. *Biocontrol, Science and Technology* **3**, 13-19.
- HORWITZ, J.P., CHUA, M.N., DONATTI, J.T. & FREISLER, J. (1966). Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *Journal of Medical Chemistry* **9**, 447.
- HUBBARD, J.P., HARMAN, G.E. & ECKENRODE, C.J. (1982). Interaction of a biological control agent, *Chaetomium globosum*, with seed coat microflora. *Canadian Journal of Microbiology* **28**, 431-437.
- JARAI-KOMLODI, M. & TOTH, S. (1993). Studies on rare airborne fungal spores and conidia in Hungary. *Acta Botanica Hungarica* **38**, 283-299.
- JAHNEN, W. & HAHLBROCK, K. (1988). Cellular localization of nonhost resistance reaction of parsley (*Petroselinum crispum*) to fungal infection. *Planta* **173**, 197-204.
- JOHNSON, L.V., WALSH, M., BOCHUS, B. & CHEN, L.B. (1981). Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *Journal of Cell Biology* **88**, 526-535.
- KARNOVSKY, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**, 137-138.
- KARPOVICH-TATE, N., SPANU, P. & DEWEY, F.M. (1998). Use of monoclonal antibodies to determine biomass of *Cladosporium fulvum* in infected tomato leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 710-716.

- KAY, S.J. & STEWART, A. (1994). Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. *Plant Pathology* **43**, 371-377.
- KNUDSEN, I.B.M., HOCKENHULL, J. & JENSEN, D.F. (1995). Biocontrol of seedling diseases of barley and wheat caused by *Fusarium culmorum* and *Bipolaris sorokiniana*: effects of selected fungal antagonists on growth and yield components. *Plant Pathology* **44**, 467-477.
- KÖHL, J., VAN DER PLAS, K.H., MOLHOEK, W.M.L. & FOKKEMA, N.J. (1995). Effect of interrupted leaf wetness periods on suppression of sporulation of *Botrytis allii* and *B. cinerea* by antagonists on dead onion leaves. *European Journal of Plant Pathology* **101**, 627-637.
- KÖHL, J., BÉLANGER, R.R. & FOKKEMA, N.J. (1997). Interaction of four antagonistic fungi with *Botrytis aclada* in dead onion leaves: a comparative microscopic and ultrastructural study. *Phytopathology* **87**, 634-642.
- KOGEL, K.-H., BECKHOVE, U., DRESCHERS, J., MÜNCH, S. & ROMMÉ, Y. (1994). Acquired resistance in barley. *Plant Physiology* **106**, 1269-1277.
- KOMBRINK, E. & SOMSSICH, I.E. (1995). Defense responses of plants to pathogens. *Advances in Botanical Research* **21**, 1-34.
- KOMMEDAHL, T. & CHANG, I. (1975). Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. *Phytopathology* **65**, 296-300.
- KREISEL, H. & SCHAUER, F. (1987). *Methoden des mycologischen Laboratoriums*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 181 S.
- KUC, J. (1997). Molecular aspects of plant responses to pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* **19**, 551-559.
- KUROSAKI, F. & NISHI, A. (1984). Elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Physiological Plant Pathology* **24**, 169-176.
- KUROSAKI, F., AMIN, M. & NISHI, A. (1986). Induction of phytoalexin production and accumulation of phenolic compounds in cultured carrot cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **28**, 359-370.

- KUROSAKI, F., TASHIRO, N. & NISHI, A. (1987a). Induction, purification and possible function of chitinase in cultured carrot cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **31**, 201-210.
- KUROSAKI, F., TASHIRO, N. & NISHI, A. (1987b). Secretion of chitinase from cultured carrot cells treated with fungal mycelial walls. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **31**, 211-216.
- LEIFERT, C., MORRIS, C.E. & WAITES, W.M. (1994). Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. *Critical Review in Plant Science* **13**, 139-183.
- LIBBERT, E. (1993). *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 434 S.
- LOWRY, O.H., ROSEBURGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1952). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- MACDONALD, M.M., DUNSTAN, R.H., DEWEY, F.M. (1989). Detection of low- M_r glycoproteins in surface washes of some fungal cultures by gel filtration HPLC and by monoclonal antibodies. *Journal of General Microbiology* **135**, 375-383.
- MAGAN, N. & LYNCH, J.M. (1986). Waterpotential, growth and cellulolysis of fungi involved in decomposition of cereal residues. *Journal of General Microbiology* **132**, 1181-1187.
- MANDAL, S., SRIVASTAVA, K.D., AGGARVAL, R. & SINGHI, D.V. (1999). Mycoparasitic action of some fungi on spot blotch pathogen (*Drechslera sorokiniana*) of wheat. *Indian Phytopathology* **52**, 39-43.
- MILLER, S.A. (1996). Detecting propagules of plant pathogenic fungi. *Advances in Botanical Research* **23** (Pathogen indexing technologies), 73-102.
- NATORI, S. (1986). Cytochalasins-actin modifiers as a group of mycotoxins. In *Developments in Toxicology and Environmental Science Vol. 12: New Concepts and Developments in Toxicology*. (ed. P.L. Chambers, P. Gehring und F. Sakai). Elsevier Science Publishers B.V., S. 291-299.

- NEWTON, A.C. & REGLINSKI, T. (1993). An enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying mildew biomass. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **100**, 176-179.
- OERKE, E.C. & SCHOENBECK, F. (1992). Ertragsverluste und Pflanzenschutz im Getreidebau - ein Überblick zur Situation weltweit. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* **283**, 47.
- OERKE, E.C., STEINER, U. & SCHOENBECK, F. (1989). The efficiency of induced resistance under practical culture conditions. V. Powdery mildew and grain yield of winter and spring barley in relation to nitrogen fertilization. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **96**, 140-153.
- OLIVARES, F.L., JAMES, E.K., BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. (1997). Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist* **135**, 723-737.
- PETERS, J.H. & BAUMGARTEN, H. (1992). *Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 488 S.
- PETRINI, O. (1984). Endophytic fungi in british ericaceae: a preliminary study. *Transactions of the British Mycological Society* **83**, 510-512.
- PETRINI, O. (1986). Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In *Microbiology of the Phyllosphere* (ed. N.J. Fokkema und J. van den Heuvel). Cambridge University Press, Cambridge, UK, S. 175-187.
- PETRINI, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial Ecology of Leaves* (ed. J.H. Andrews und S.S. Hirano). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 179-197.
- PEREIRA, J. & DHINGA, O.D. (1997). Suppression of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* in soybean stems by *Chaetomium globosum*. *Plant Pathology* **46**, 216-223.
- PRATT, R.G. & KNIGHT, W.E. (1983). Relationships of planting density and competition to growth characteristics and internal crown breakdown in arrowleaf clover. *Phytopathology* **73**, 980-983.

- PRESTIDGE, R.A. & BALL, O.J.-P. (1997). A catch 22: the utilization of endophytic fungi for pest management. In *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems* (ed. A.C. Gange und V.K. Brown). Blackwell Science Ltd, Cambridge University Press, UK, S. 171-192.
- PRUSKY, D. FREEMAN, S., RODRIGUEZ, R.J. & KEEN, N. T. (1994). A nonpathogenic mutant strain of *Colletotrichum magna* induces resistance to *C. gloeosporioides* in Avocado fruits. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 326-333.
- RAMALINGHAM, K. & RAVINDRANATH, M.H. (1970). Histochemical significance of green metachromasia to toluidine blue. *Histochemie* **24**, 322-327.
- RASMUSSEN, J.B., HAMMERSCHMIDT, R. & ZOOK, M.N. (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiology* **97**, 1342-1347.
- REDMAN, R.S., RANSON, J.C. & RODRIGUEZ, R.J. (1999). Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 969-975.
- REY, P., BENHAMOU, N., WULFF, E. & TIRILLY Y. (1998a). Interactions between tomato (*Lycopersicon esculentum*) root tissues and the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**, 105-122.
- REY, P., BENHAMOU, N. & TIRILLY, Y. (1998b). Ultrastructural and cytochemical investigation of asymptomatic infection by *Pythium* spp. *Phytopathology* **88**, 234-244.
- RICKER, R.W., MAROIS, J.J., DLOTT, J.W., BOSTOCK, R.M. & MORRISON, J.C. (1991). Immunodetection and quantification of *Botrytis cinerea* in harvested wine grapes. *Phytopathology* **81**, 404-411.
- RIESEN, T.K. & CLOSE, R.C. (1987). Endophytic fungi in propiconazole-treated and untreated barley leaves. *Mycologia* **79**, 546-552.
- RODRIGUEZ, R.J. & REDMAN, R.S. (1997). Fungal life-styles and ecosystem dynamics: biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. *Advances in Botanical Research* **24**, 169-193.
- SAVORY, J.G. (1954). Breakdown of timber by ascomycetes and fungi imperfecti. *Annals of Applied Biology* **41**, 336-347.

- SCHNEIDER-MÜLLER, S., KUROSAKI, F. & NISHI, A. (1994). Role of salicylic acid and intracellular Ca^{2+} in the induction of chitinase activity in carrot suspension culture. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **45**, 101-109.
- SCHOENE, P., LENNARTZ, B. & OERKE, E.C. (1999). Fungicide sensitivity of fungi used for biocontrol of perthotrophic pathogens. In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds II* (ed. H. Lyr, P.E. Russell, H.W. Dehne, H.D. Sisler). 12th International Rheinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, 24th-29th May 1998. Intercept LTD, Andover, UK, S. 477-482.
- SCHULZ, B., WANKE, U., DRAEGER, S. & AUST, H.-J. (1993). Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research* **97**, 1447-1450.
- SCHULZ, B., GUSKE, S., DAMMANN, U. & BOYLE, C. (1998). Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* **25**, 213-227.
- SEQUERRA, J., ANDRÉ, C., GIANINAZZI-PEARSON, V. & MOIROUD, A. (1995). Ultrastructure of cortical root cells of *Alnus incana* infected by *Penicillium nodositatum*. *New Phytologist* **130**, 545-555.
- SITTE, P. (1991). Morphologie. In *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen* (begründet von E. Strasburger, F. Noll, H. Schenck, A.F.W.Schimper). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 11-238.
- STEINER, U. & SCHÖNBECK, F. (1995). Induced resistance in monocots. In *Induced Resistance to Disease in Plants* (ed. R. Hammerschmidt und J. Kuc). Kluwer Academic Publishers, London, S. 86-110.
- STENZEL, K., STEINER, U. & SCHÖNBECK, F. (1985). Effect of induced resistance on the ability to reduce powdery mildew haustoria in wheat and barley. *Physiological Plant Pathology* **27**, 357-367.
- STONE, J.K., VIRET, O., PETRINI, O. & CHAPELA, I.H. (1994). Histological Studies of host penetration and colonization by endophytic fungi. In *Host Wall Alterations by Parasitic Fungi* (ed. O. Petrini und G. B. Ouellette). APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, S. 115-126.
- SULAIMAN, O. & MURPHY, R.J. (1994). Soft rot decay in bamboo. *Material und Organismen* **28**, 167-195.

TANAKA, H., FUSE, G. & ENOKI, A. (1992). Soft rot of wood caused by three microfungi grown on four media. *Material und Organismen* **27**, 157-170.

TEMPLETON, M.D., RIKKERINK, E.H.A. & BEEVER, R.E. (1994). Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 320-325.

THORNTON, M.D. & DEWEY, F.M. (1996). Detection of phialoconidia of *Trichoderma harzianum* in peat-bran using a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycological Research* **100**, 217-222.

THORNTON, C.R. & GILLIGAN, C.A. (1999). Quantification of the effect of the hyperparasite *Trichoderma harzianum* on the saprotrophic growth dynamics of *Rhizoctonia solani* in compost using a monoclonal antibody-based ELISA. *Mycological Research* **103**, 443-448.

THORNTON, C.R., DEWEY, F.M. & GILLIGAN, C.A. (1993). Development of monoclonal antibody-based immunological assays for the detection of live propagules of *Rhizoctonia solani* in soil. *Plant Pathology* **42**, 763-773.

THORNTON, C.R., DEWEY, F.M. & GILLIGAN, C.A. (1994). Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of live propagules of *Trichoderma harzianum* in a peat-bran medium. *Soil Biology and Biochemistry* **26**, 909-920.

THORNTON, C.R., DEWEY, F.M. & GILLIGAN, C.A. (1997). Production and characterization of a monoclonal antibody raised against surface antigens from mycelium of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*: evidence for an extracellular polyphenol oxidase. *Phytopathology* **87**, 123-131.

TVEIT, M. & MOORE, M.B. (1954). Isolates of *Chaetomium* that protect oats from *Helminthosporium victoriae*. *Phytopathology* **44**, 686-689.

TVEIT, M. & WOOD, R.K.S. (1955). The control of *Fusarium* blight in oat seedlings with antagonistic species of *Chaetomium*. *Annals of Applied Biology* **43**, 538-552.

UDAGAWA, S. (1984). Taxonomy of mycotoxin-producing *Chaetomium*. In *Toxigenic Fungi-Their Toxins and Health Hazards* (ed. H. Kurata und Y. Ueno). 3rd International Mycological Congress, Elsevier Verlag, Amsterdam, Tokyo, S. 139-147.

- VILICH, V. (1995). Decreased susceptibility of barley and oats against leaf pathogens by seed inoculation of a nonpathogenic fungus and antagonistic rhizobacteria. In *Environmental biotic factors in integrated plant disease control* (ed. M. Manca). 3rd Conference of EFPP, Polish Phytopathological Society, Poznan, S. 583-586.
- VILICH-MELLER, V. & WELTZIEN, H.C. (1990). Resistenzinduktion in Gerste und Hafer durch Vorinokulation mit Apathogenen, ein befallsmindernder Mechanismus in gemischten Getreidebeständen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **97**, 552-543.
- VILICH, V., DOLFEN, M. & SIKORA, R.A. (1998). *Chaetomium* spp. colonization of barley following seed treatment and its effects on plant growth and *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* disease severity. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **105**, 130-139.
- WAINWRIGHT, M. (1992). The impact of fungi on environmental biogeochemistry. In *The Fungal Community. Its Role and Organization in the Ecosystem* (ed. C. Carroll und T. Wicklow). Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, S. 601-618.
- WALTER, D. & GINDRAT, D. (1988). Biological control of damping-off of sugar beet and cotton with *Chaetomium globosum* or a fluorescent *Pseudomonas* sp. *Canadian Journal of Microbiology* **34**, 631-537.
- WEBBER, J. (1981). A natural control of dutch elm disease. *Nature* **292**, 449-451.
- WELLER, D.M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **26**, 379-407.
- WESSELS, J.G.H. (1994). Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 413-437.
- WESSELS, J.G.H. (1997). Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface. *Advances in Microbial Physiology* **38**, 1-45.
- WESSELS, J.G.H., DE VRIES, O.M.H., ÁSGEIRSDÓTTIR, S.A. & SCHUREN, F.H.J. (1991). Hydrophobin genes involved in formation of aeral hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *The Plant Cell* **3**, 794-799.
- WILLITS, M.G. & RYALS, J.A. (1998). Determining the relationship between salicylic acid levels and systemic acquired resistance induction in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 795-800.

WICKLOW, D.T. (1979). Hair ornamentation and predator defence in *Chaetomium*. Transactions of the British Mycological Society **72**, 107-110.

WOLF, D.C., DAO, T.H., SCOTT, H.D. & LAVY, T.L. (1989). Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical, and chemical properties. Journal of Environmental Quality **18**, 39-44.

WUBBEN, J.P., BOLLER, T., HONEE, G. & DeWIT, P.J.G.M. (1997). Molecular and biochemical aspects of host-pathogen-interactions; with prospects for molecular resistance breeding. In *Resistance of Crop Plants against Fungi* (ed. H. Hartleb, R. Heitefuss, H.-H. Hoppe). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 202-237.

YEDIDA, I., BENHAMOU, N. & CHET, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus*, L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology **65**, 1061-1070.

ZEYEN, R.J., BUSHNELL, W.R., CARVER, T.L.W., ROBBINS, M.P., CLARK, T.A., BOYLES, D.A. & VANCE, C.P. (1995). Inhibiting phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl-alcohol dehydrogenase suppresses *Mla1* (HR) but not *mlo5* (non-HR) barley powdery mildew resistances. Physiological and Molecular Plant Pathology **47**, 119-140.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Richard A. Sikora für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die stetige Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit. Ganz besonders möchte ich ihm für die Unterstützung bei der Anfertigung der Publikation und für den großzügigen Freiraum beim wissenschaftlichen Arbeiten danken.

Frau Prof. Dr. Heide Schnabl danke ich für das Interesse an der Arbeit und für die Übernahme des Korreferats.

Frau PD. Dr. Vivian Vilich danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Initiierung des Projektes und das Interesse an der Arbeit.

Bei Herrn Dr. Stephan Winter und den Mitarbeitern der DSMZ, Abteilung Pflanzenviren, in Braunschweig möchte ich mich besonders herzlich für die Herstellung der Antikörper, die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe während der Erarbeitung der ersten TPIs und ELISAs und für die kritische Durchsicht der Arbeit bedanken. Die stetige Unterstützung und die kritischen Kommentare übers Netz haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für die kollegiale Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die wunderbaren Abende im Institutsgarten und im 'Seminarraum' bedanken. Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Abteilung 'Phytomedizin in Bodenökosystemen' und den Mitarbeitern der Abteilung 'Pflanzenkrankheiten', insbesondere Frau PD. Dr. Ulrike Steiner, Herrn PD. Dr. Joachim Hamacher, Frau Gaby Jende und Frau Inge Neukirchen für das Interesse an der Arbeit und die stetige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der histologischen Untersuchungen.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Stephan Steckelbroeck für die ausgesprochen kritische Durchsicht der Arbeit und für die Diskussionsexkurse fern der Institutsräume.

Für die finanzielle Unterstützung des Projekts danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.